



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



**Carreadores lipídicos nanoestruturados
associados ou não ao valerato de betametasona
e/ou α tocoferol para uso tópico em modelo
experimental de dermatite atópica:
Desenvolvimento, caracterização e avaliação
da eficácia terapêutica**

Hellen Dayane Silva Borges

Uberlândia – MG

Fevereiro - 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



**Carreadores lipídicos nanoestruturados
associados ou não ao valerato de betametasona
e/ou α tocoferol para uso tópico em modelo
experimental de dermatite atópica:
Desenvolvimento, caracterização e avaliação
da eficácia terapêutica**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte das exigências para obtenção do título de Doutorado.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Hellen Dayane Silva Borges

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Orientador

Dr. Rafael de Oliveira Resende

Co-orientador

Uberlândia – MG

Fevereiro - 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B732c
2024 Borges, Hellen Dayane Silva, 1992-
Carreadores lipídicos nanoestruturados associados ou não ao valerato de betametasona e/ou α tocoferol para uso tópico em modelo experimental de dermatite atópica [recurso eletrônico] : desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia terapêutica / Hellen Dayane Silva Borges. - 2024.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.

Coorientador: Rafael de Oliveira Resende.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.5029>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

I. Imunologia. I. Taketomi, Ernesto Akio, 1963-, (Orient.). II. Resende, Rafael de Oliveira, 1980-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 159				
Data:	26/02/2024	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18 h 15 min
Matrícula do Discente:	11723IPA002				
Nome do Discente:	Hellen Dayane Silva Borges				
Título do Trabalho:	Carreadores lipídicos nanoestruturados associados ou não ao valerato de betametasona e/ou alpha tocoferol para uso tópico em modelo experimental de dermatite atópica: Desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia terapêutica				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biotecnologia empregada no diagnóstico e controle de doenças				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização molecular e produção de antígenos recombinantes para fins de diagnóstico, acompanhamento e tratamento de doenças alérgicas				

Em 26 de fevereiro de 2024, às 14:00 horas, reuniu-se por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos membros titulares: Ernesto Akio Taketomi - ICBIM - UFU (Presidente) orientador da candidata; Vinícius de Frias Carvalho - LABINFLA - Instituto Oswaldo Cruz (IOC); Marcos Vinicius da Silva - UFTM; Celene Maria de Oliveira Simões Alves - DEFAR - ICBIM - UFU; Gesmar Rodrigues Silva Segundo - FAMED - UFU.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Prof. Ernesto Akio Taketomi, apresentou a Comissão Examinadora e a candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação, o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ernesto Akio Taketomi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/02/2024, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius de Frias Carvalho, Usuário Externo**, em 27/02/2024, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Vinicius da Silva, Usuário Externo**, em 27/02/2024, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celene Maria de Oliveira Simoes Alves, Coordenador(a)**, em 27/02/2024, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gesmar Rodrigues Silva Segundo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/02/2024, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5218075** e o código CRC **94591D4C**.

*Aos meus pais José Dilson e Maria da Glória
e minha irmã Hanna Kárta (in memoriam).*

"Não tenha medo do trabalho duro. Nada que vale a pena vem facilmente. Não deixe os outros desencorajar você ou dizer que você não pode fazer isso. No meu dia me disseram que as mulheres não entraram em química. Eu não vi nenhuma razão para que não pudéssemos."

Gertrude Belle Elion

Agradecimentos

A Deus por todas as graças e bênçãos durante toda minha vida acadêmica e, em especial durante meu doutorado. Por ser meu amparo e me conceder força e coragem nos momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa oferecida ao que possibilitou a realização do meu doutorado.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) por me proporcionar um local de excelência em pesquisa e ensino, para toda a minha formação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, por me acolher no laboratório, acreditando no meu trabalho, pela orientação, pelas conversas, risadas e pelos inúmeros aprendizados.

Ao meu co-orientador Dr. Rafael Resende, por ser esse ser humano de coração gigante, que não mediu esforços para ajudar, por todo apoio e incentivo que foram essenciais não somente para o desenvolvimento da minha tese, mas também para a mudança da visão que eu tinha sobre minha carreira profissional.

Ao Prof. Dr. Claudio Roberto Duarte e seu aluno José Alair, do Instituto de Química da UFU pela disponibilidade e disposição em nos ajudar.

À Universidade de Campinas (UNICAMP) e à Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), instituições parceiras que abriram as portas para que eu pudesse desenvolver parte do meu trabalho. Agradeço imensamente por essa oportunidade.

À Profa. Dra. Eneida de Paula, pela parceria essencial para a construção deste trabalho, por prontamente ter sido tão solícita e prestativa.

À Dra. Ludmilla David de Moura, amiga que ganhei durante a graduação e que acabou se tornando minha irmã ao longo desses anos. Por ser essa pessoa extraordinária, alegre, apaixonada pelo que faz, simples e excelente profissional. Te admiro demais! Eu nem tenho palavras que possam expressar tamanha gratidão por toda a ajuda na construção deste trabalho, por todo apoio e amizade.

Ao Dr. Itauá, pela recepção, generosidade e pela ajuda nos ensaios realizados na Fiocruz.

À Dona Zilda (técnica do laboratório), Lucélia e Lucineide (secretárias da pós-graduação), Débora (técnica do laboratório de Patologia da Odontologia), Juliana (técnica do laboratório de parasitologia), Ana Cláudia (técnica do laboratório de Imunologia) por toda cordialidade e prestatividade ao longo dessa trajetória.

À minha avó Maria José, por todas as orações, pelo carinho e palavras de fé, consolo e incentivo.

Aos meus amados pais, por todo amor, carinho e compreensão. Por serem minha base, meu espelho, por me ensinarem valores essenciais para a formação do meu caráter, como ser humano e profissional. Pelo apoio incondicional e incentivo, ao longo de todos esses anos de formação.

Ao meu noivo William, por todo amor, carinho, parceria, paciência e compreensão das minhas ausências na escrita da tese e por sempre me apoiar no meu crescimento profissional. Te amo!

Às amigas que construí ao longo desses anos no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica: Alfredo, Alessandro, Alessandra, Bethania, Karine, Laura e Vinícius, por toda a dedicação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho, aos sábados, domingos e feriados. Agradeço o companheirismo, pelos almoços de boas conversas e risadas. Com certeza levarei todos vocês sempre no coração.

Agradeço também aos companheiros do Laboratório de Imunoparasitologia Dr. Mário Endsfeldz: Fernando e Iasmin, pela amizade e disposição.

A todos os animais que participaram deste estudo e que desempenharam um papel essencial para o desenvolvimento das pesquisas, contribuindo imensamente com a ciência, deixo meu agradecimento e respeito.

RESUMO

Dermatite atópica (DA) apresenta grande importância para saúde pública, sendo considerada a doença crônica inflamatória de pele mais prevalente globalmente. Emolientes para reduzir a secura da pele, corticosteroides tópicos para inflamação e anti-histamínicos de uso oral para reduzir o prurido estão entre as terapias de primeira linha da DA. Apesar da eficácia comprovada desses tratamentos, o uso frequente está associado a efeitos adversos, limitando a adesão do paciente a terapia. Dessa forma, a ideia é propor um produto, utilizando a nanotecnologia para encapsulação do α -tocoferol e/ou valerato de betametasona (VB) em formulações tópicas para o tratamento da DA. As formulações desenvolvidas por ultrassonicação apresentaram tamanhos entre $190,8 \pm 1,5$ nm e $209,0 \pm 3,5$ nm e valores de índice de polidispersão (PDI) menores que 0,20, indicando uma população de nanocarreadores homogênea e com baixa variabilidade. Imagens por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram nanocarreadores lipídicos (NLCs) esféricos e monodispersos, indicando boa reprodutibilidade. Potencial zeta (PZ) apresentou valores entre $-25,9 \pm 0,90$ e $-34,1 \pm 0,87$ mV compatível com formulações estáveis, com repulsão de cargas entre as partículas, impedindo a agregação. O pH das formulações de NLCs foram ligeiramente ácidos, variando entre 6 e 7, semelhante ao pH da pele e alta eficiência de encapsulação do VB (>98%), sugerindo boa aplicabilidade para uso tópico. As formulações tiveram concentração na ordem de 10^{13} NLCs/mL, indicando bom rendimento. A 25°C , NLC_{controle}, NLC α e NLC_{VB} apresentaram boa estabilidade ao longo de 12 meses, enquanto NLC_{VB α} recomenda-se o uso em até 10 meses. Ensaios com células HaCat mostraram que o encapsulamento de valerato de betametasona (VB) reduz a citotoxicidade apresentada pelo fármaco livre, enquanto a citotoxicidade do α tocoferol é aumentada com o encapsulamento. Com o encapsulamento do α tocoferol com VB essa citotoxicidade é reduzida. Dados de reologia mostraram que os hidrogéis produzidos com goma xantana e colágeno exibiram comportamento não-newtoniano, compatível para fornecer um fluxo lento do fármaco e fácil distribuição na pele. A sensibilização e os desafios com dinitroclorobenzeno (DNCB) foram eficientes em produzir um modelo de DA. Animais tratados com Hidrogel, NLC_{controle} e NLC α exibiram um aumento do espessamento epidérmico e altas pontuações para os sinais clínicos da DA. Análises histológicas revelaram uma epiderme espessa e um intenso infiltrado de células inflamatórias, demonstrando um quadro grave de DA. O tratamento com NLC_{VB}, NLC_{VB α} , VB_{comercial} reduziu a espessura da orelha e apresentou melhora dos parâmetros clínicos, sugerindo melhora dos sintomas da DA, com epiderme de espessura semelhante aos animais controle e redução significativa de células inflamatórias nas lesões epiteliais. O tratamento com VB não exerce efeito sobre a produção de IgE sérica, mas NLC_{VB} e VB_{comercial} reduziram os níveis de IgE localmente. O modelo de DA induzido por DNCB, estimula uma resposta Th1 e Th2, com a produção de IFN γ , TNF α , IL-6 e IL-4, mas não de IL-2, IL-17A e IL-10, sugerindo uma inflamação crônica. NLC_{VB}, NLC_{VB α} e VB_{comercial} reduziram eficazmente a liberação das citocinas produzidas na inflamação epitelial provocada pela aplicação tópica de DNCB. Por fim, acreditamos que as formulações desenvolvidas com NLC_{VB} e NLC_{VB α} tratam eficazmente a DA experimental.

Palavras-chave: valerato de betametasona, tocoferol, nanocarreador à base de lipídeos, carreadores lipídicos nanoestruturados, dermatite atópica.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is of great importance for public health, being considered the most prevalent chronic inflammatory skin disease globally. Emollients to reduce skin dryness, topical corticosteroids for inflammation, and oral antihistamines to reduce itching are among the first-line AD therapies. Despite the proven effectiveness of these treatments, frequent use is associated with adverse effects, limiting patient adherence to therapy. Therefore, the idea is to propose a product, using nanotechnology to encapsulate α -tocopherol and/or betamethasone valerate (VB) in topical formulations for the treatment of AD. The formulations developed by ultrasonication presented sizes between 190.8 ± 1.5 nm and 209.0 ± 3.5 nm and polydispersity index (PDI) values lower than 0.20, indicating a homogeneous nanocarrier population with low variability. Transmission electron microscopy (TEM) images showed spherical and monodisperse lipid nanocarriers (NLCs), indicating good reproducibility. Zeta potential (PZ) presented values between -25.9 ± 0.90 and -34.1 ± 0.87 mV compatible with stable formulations, with charge repulsion between particles, preventing aggregation. The pH of the NLCs formulations were slightly acidic, varying between 6 and 7, like the pH of the skin and high VB encapsulation efficiency (>98%), suggesting good applicability for topical use. The formulations had concentrations in the order of 1013 NLCs/mL, indicating good yield. At 25°C, NLC_{control}, NLC _{α} e NLC_{BV} showed good stability over 12 months, while NLC_{BV α} is recommended for use within 10 months. Assays with HaCat cells showed that betamethasone valerate (VB) encapsulation reduces the cytotoxicity presented by the free drug, while the cytotoxicity of α -tocopherol is increased with encapsulation. With the encapsulation of α -tocopherol with VB, this cytotoxicity is reduced. Rheology data showed that hydrogels produced with xanthan gum and collagen exhibited non-Newtonian behavior, compatible with providing slow drug flow and easy distribution into the skin. Dinitrochlorobenzene (DNCB) sensitization and challenges were effective in producing an AD model. Animals treated with Hydrogel, NLC_{control} and NLC _{α} exhibited increased epidermal thickening and high scores for clinical signs of AD. Histological analyzes revealed a thick epidermis and an intense infiltrate of inflammatory cells, demonstrating a severe condition of AD. Treatment with NLC_{BV}, NLC_{BV α} , VB_{commercial} reduced ear thickness and showed improvement in clinical parameters, suggesting improvement in AD symptoms, with an epidermis of similar thickness to control animals and a significant reduction in inflammatory cells in epithelial lesions. Treatment with BV had no effect on serum IgE production, but NLC_{BV} and VB_{commercial} reduced IgE levels locally. The DNCB-induced AD model stimulates a Th1 and Th2 response, with the production of IFN γ , TNF α , IL-6 and IL-4, but not IL-2, IL-17A and IL-10, suggesting a chronic inflammation. NLC_{BV}, NLC_{BV α} and VB_{commercial}, effectively reduced the release of cytokines produced in epithelial inflammation caused by the topical application of DNCB. Finally, we believe that the formulations developed with NLC_{BV} and NLC_{BV α} effectively treat experimental AD.

Keywords: betamethasone valerate, tocopherol, lipid-based nanocarrier, nanostructured lipid carriers, atopic dermatitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental da DA por DNCB e tratamento com as formulações de uso tópico.....63

Figura 2. Representação esquemática das NLC com base na estimativa da quantidade aproximada de moléculas de Miristato de Miristila (MM), Miglyol 812 (MG), Poloxamer 188 (P188), α -tocoferol e valerato de betametasona (VB), calculada por meio dos dados obtidos por NTA (Tabela 4). Criado com software Canva (2023).....70

Figura 3. Estabilidade das formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC α e NLC_{VB α} ao longo de 12 meses. **(A-D)** Variação do tamanho médio, **(E-H)** variação do PDI e **(I-L)** variação do Potencial Zeta das partículas em função tempo. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças estatisticamente significantes do tempo 0 foram determinadas por *Two way* ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey com significância para * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$72

Figura 4. Micrografias eletrônicas de transmissão das nanopartículas lipídicas das formulações NLC_{controle} (A-B), NLC α (C-D), NLC_{VB} (E-F) e NLC_{VB α} (G-H). Magnitudes: 60.000x (A, C, E, G) e 10.000x (B), 20.000x (D e H), 30.000x (F). Escala = 200 nm ou 500 nm.....73

Figura 5. Análise da viabilidade de células HaCat após incubação com as formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC α e NLC_{VB α} em diferentes concentrações de partículas, por ensaio de MTT. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 horas de incubação com 10^7 - 10^{13} NLC/mL das formulações desenvolvidas. Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana \pm variância e média \pm desvio padrão apenas para o grupo NLC_{VB}. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por Kruskal Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn ou *One-Way* ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey, com significância para * $p < 0,05$74

Figura 6. Análise da viabilidade celular por MTT após incubação com as formulações desenvolvidas, em diferentes molaridades de VB e α -tocoferol livres ou encapsulados. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 ou 72 horas de incubação com 0,06 a 2,5 mM de VB_{livre} ou NLC_{VB} **(A)**; 1,5 a 6 mM α -tocoferol livre ou NLC α **(B)** e 1,5 a 6 mM de NLC_{controle} **(C)** ou NLC_{VB α} **(D)**. Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana \pm variância e média \pm desvio padrão apenas para o grupo NLC_{controle} 72 horas de estímulo. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas em comparação com o controle negativo, utilizando o teste de Mann Whitney ou Teste T não pareado com correção de Welch, com significância para * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$76

Figura 7. Representação esquemática do hidrogel contendo as nanoformulações. Criado com software Canva (2023).....77

Figura 8. Determinação das propriedades viscoelásticas dos hidrogéis de xantana-colágeno preparados com a incorporação das NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC_α ou NLC_{VBα}, utilizando reometria oscilatória, com temperatura constante (25 °C).....78

Figura 9. Avaliação clínica da DA experimental. **(A)** Imagens das lesões nas orelhas dos camundongos no último dia experimental. **(B)** *score* de DA ao longo do tratamento **(C)** *score* de DA por parâmetro clínico no dia 24, **(D)** espessura da orelha e **(E)** peso dos camundongos tratados com diferentes hidrogéis híbridos ao longo do protocolo experimental. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste de Kruskal wallis com teste de comparação múltipla de Dunn. Diferenças estatísticas em relação ao grupo DNCB são representadas por **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001 e em relação ao grupo controle por #*p* < 0,05; ##*p* < 0,01; ###*p* < 0,001 e ####*p* < 0,0001.....82

Figura 10. Perfil histológicos da orelha de camundongos tratados com diferentes hidrogéis contendo compostos de fármacos valerato de betametasona e/ou α-tocoferol nanoencapsulados em NLCs, em modelo de DA. As secções foram coradas com H&E (aumento de 100x). Escala das barras: 200 mM.....83

Figura 11. Infiltrado de mastócitos na orelha dos camundongos tratados com diferentes hidrogéis em modelo de DA corado com azul de toluidina **(A)** (aumento de 100x). O número de mastócitos foi observado em três lâminas de animais diferentes **(B)**. As setas vermelhas indicam os mastócitos. Escala das barras: 64 mM. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn, representadas por **p* < 0,05 e ****p* < 0,001, quando comparadas com o grupo DNCB e ###*p* < 0,001 em relação ao grupo controle.....85

Figura 12. Efeito do tratamento com diferentes hidrogéis na concentração de IgE total mensurados por ELISA em amostras de homogenato de tecido de orelha **(A)** e no soro **(B)** de camundongos, em modelo experimental de DA. Os dados estão representados como e média ± desvio padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann Whitney, representadas por **p* < 0,05, quando comparadas com o grupo DNCB e ###*p* < 0,001 e ####*p* < 0,0001 em relação ao grupo controle.....86

Figura 13. Efeito do tratamento com diferentes hidrogéis híbridos na concentração das citocinas IFN γ , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-10, IL-2 e TNF α nas amostras de homogenato de tecido de orelha de camundongos com DA experimental, analisadas por citometria de fluxo. Os dados estão representados como e mediana ± variância. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann Whitney, representadas por **p* < 0,05 e ***p* < 0,01 quando comparadas com o grupo DNCB e #*p* < 0,01 em relação ao grupo controle.....88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição e proporção dos compostos utilizados no preparo das diferentes formulações.....57
- Tabela 2.** Análise do tamanho hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (PZ) medidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), pH e eficiência de encapsulação das formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC_α e NLC_{VBα}, após 24h da síntese.....68
- Tabela 3.** Análise do tamanho hidrodinâmico (nm) e concentração de partículas/mL, medidas por rastreamento de nanopartículas (ou Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) nas formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC_α e NLC_{VBα}, após 24h da síntese.....69
- Tabela 4.** Resultados de NTA: número estimado de moléculas de excipiente por NLC calculado a partir de sua concentração molar na formulação.....70
- Tabela 5.** Valores de IC50 determinados para as formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC_α e NLC_{VBα}, em células HaCat.....72
- Tabela 6.** - Valores de IC50 determinados para VB em solução (VB_{livre}) ou encapsulado (NLC_{VB}), em células HaCat.....77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Análise de variância
anti-IgE	Anticorpo contra IgE
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> - Células apresentadoras de antígenos
BALB/c	Linhagem de camundongo “Bagg e Albino”
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BSA	Soro albumina bovina
°C	Grau <i>Celsius</i>
CBA	<i>Citometric bead array</i> - Ensaio citométrico em esferas
CCL	Quimiocina tipo CC
CCR3	<i>C-C chemokine receptor type 3</i> – Receptor de quimiocina tipo 3
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CEUA	Comitê de Ética de Utilização Animal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
DA	Dermatite atópica
DCA	Dermatite de contato alérgica
DCs	<i>Dendritic Cells</i> – Células dendríticas
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> -Espalhamento Dinâmico de Luz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNCB	Dinitroclorobenzeno
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EE%	Porcetagem de eficiência de encapsulamento
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ELS	Espalhamento de luz eletroforético
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
FDA	Food and Drug Administration
FLG	Filagrina
Foxp3+	<i>Forkhead Box P3</i>
g	Gravitacional
GATA3	Fator de Transcrição Específico de Células T
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> – Fator estimulador de colônia de macrófago e granulócitos
H&E	Hematoxilina e Eosina
IC50	Concentração inibitória em relação a 50% do inicial
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
	<i>Inflammatory Dendritic Epidermal Cells</i> - Células Dendríticas Epidérmicas
IDECs	Inflamatórias
IFN α	Interferon alfa
IFN γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina

ILC2s	<i>Innate Lymphoid cells type 2</i> – Células linfoides inatas tipo 2
ILCregs	<i>Regulatory Innate Lymphoid cells</i> – Células linfoides inatas regulatórias
JAK	Janus quinase
kDa	Quilodalton
LCs	<i>Langerhans Cells</i> – Células de Langerhans
M	Molar
M2	Macrófago tipo 2
mA	Miliampere
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> - Proteína Químioatraente de Monócitos 1
MG	Migliol
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade tipo 2
mL	Mililitro
MM	Miristato de Miristila
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico Mensageiro
MTT	Tetrazólio de Metiltiazol
mV	Milivolts
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Factor Nuclear Kappa B
NLC	<i>Nanostructured Lipid Carriers</i> - Carreador Lipídico Nanoestruturado
NLC/mL	Carreador Lipídico Nanoestruturado por mililitro
NLC α	Carreador Lipídico Nanoestruturado carreando alfa tocoferol
NLC $_{VB}$	Carreador Lipídico Nanoestruturado carreando Valerato de Betametasona
NLC $_{VB\alpha}$	Carreador Lipídico Nanoestruturado carreando Valerato de Betametasona e alfa tocoferol
Nm	Nanômetro
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i> – Dominio de oligomerização de nucleotídeo
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> – Análise de monitoramento de nanopartícula
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PAMS	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> - Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> - Solução Salina Tamponada com Fosfato
PDCs	<i>Plasmocitoid Dendritic Cells</i> - Células Dendríticas Plasmocitoides
PDI	<i>Polidispersion Index</i> - Índice de Polidispersão
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de Hidrogênio
PZ	Potencial Zeta
QELS	<i>Quasi elastic light scattering</i> – Espalhamento de luz quase elástico
ROR α	
Rpm	Rotações por minuto
SC	<i>Stratum corneum</i> - Estrato córneo
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> – Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SLN	<i>Solid Lipid nanocarrier</i> – Nanocarreador de Lipídeo Sólido

STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> – Sinal de Ativação da Transcrição e Tradução
TEM	<i>Transmission Eletronic Microscopy</i> – Microscopia eletrônica de Transmissão
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i> - Fator de Transformação do Crescimento beta
Th	Célula T <i>helper</i> ou auxiliar
TJs	<i>Tigh junctions</i> – Junções oclusivas
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> – Receptor tipo Toll
TMB	TetraMetilBenzidina
TNF	<i>Tumoral Necrosis Factor</i> - Fatores de Necrose Tumoral
TPA	12-O-Tetradecanoilforbol-13-Acetato
Treg	Célula T regulatória
TSLP	<i>Thymic Stromal Linfopoetin</i> - Linfopoetina Estromal Tímica
uL	Microlitro
uM	Micromolar
v/v	Volume/volume
VB	Valerato de Betametasona
ZO-1	<i>Zonula occludens 1</i> – Zona Ocludente 1

SUMÁRIO

1. Introdução	20
1.1 Dermatite atópica	21
1.1.2 Predisposição genética	22
1.1.3 Barreira epidérmica	23
1.1.4 Fatores ambientais e hábitos de vida.....	26
1.1.5 Imunopatogênese.....	27
1.1.6 Fenótipos da DA.....	36
1.1.7 Manejo e tratamento.....	37
1.2 Nanotecnologia e entrega de medicamentos (<i>drug delivery</i>).....	39
1.3 NLC como <i>drug delivery</i> na pele.....	42
1.4 Hidrogel	44
1.5 Vitamina E	46
1.6 Valerato de betametasona	49
2. Justificativa	51
3. Objetivos.....	54
3.1 Objetivo geral	55
3.2 Objetivos específicos	55
4. Material e Métodos.....	56
4.1 Preparo e caracterização das NLCs.....	57
4.1.1 Preparo das NLCs.....	57
4.1.2 Medidas de tamanho e dispersão de partículas	58
4.1.3 Medidas de carga superficial ou potencial zeta.....	58
4.1.4 Medidas de tamanho e concentração de partículas	58
4.1.5 Medidas do Potencial Hidrogeniônico (pH).....	59
4.1.6 Ensaio de eficiência de Encapsulação (EE%).....	59
4.1.7 Estabilidade coloidal	59
4.1.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	60
4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	60
4.2.1 Cultivo celular de queratinócitos	60
4.2.2 Viabilidade celular e citotoxicidade.....	61

4.3 Preparo das formulações em hidrogel.....	62
4.3.1 Análise reológica.....	62
4.4 Ensaios <i>in vivo</i>	62
4.4.1 Modelo murino de DA e tratamento	62
4.4.2 Sinais clínicos de DA	63
4.4.4 Análise histopatológica	64
4.4.5 Quantificação de IgE total.....	64
4.4.6 Quantificação de citocinas	65
4.5 Análise estatística	65
5. Resultados	67
5.1 Tamanho, PDI, PZ, pH e %EE dos NLCs	68
5.2 Concentração de partículas por NTA.....	68
5.3 Estabilidade dos NLCs.....	70
5.4 Morfologia de NLCs	73
5.5 Viabilidade celular e citotoxicidade dos NLCs	73
5.6 Efeito do nanoencapsulamento sobre viabilidade celular/citotoxicidade	75
5.7 Viscosidade dos hidrogéis	77
5.8 Avaliação dos parâmetros clínicos.....	78
5.9 Análise histopatológica das lesões de DA	82
5.10 Quantificação de IgE total	85
5.11 Quantificação de citocinas	87
6. Discussão	89
7. Conclusão	107
Referências	109
Anexos.....	141

1. Introdução

1.1 Dermatite atópica

A Dermatite Atópica (DA) é uma doença crônica, pruriginosa e inflamatória da pele. Indivíduos que apresentam a doença sofrem períodos de remissão que são marcados por recidivas inflamatórias agudas (AVENA-WOODS, 2017). Grande parte dos doentes apresentam o prurido, podendo evoluir para dor, distúrbios do sono e manifestações clínicas de saúde mental, impactando negativamente na qualidade de vida do paciente (KIM; LI; SEO; JO *et al.*, 2012).

Estudos mostram que em grande parte dos casos, a doença se manifesta antes dos 5 anos e pode desaparecer na adolescência, ainda que haja relatos de persistência na vida adulta. Estimativas relatam que a DA afeta 15 a 20% das crianças e 1 a 4% dos adultos no mundo variando de acordo com a localização geográfica (BARBAROT; AUZIERE; GADKARI; GIROLOMONI *et al.*, 2018). A alta prevalência e a carga substancial de cuidados de saúde, com maior utilização, custos diretos e indiretos de cuidados e perda de produtividade no trabalho e do rendimento escolar, a tornam a doença de pele mais onerosa no mundo, seguida pela acne e psoríase (SACOTTE; SILVERBERG, 2018).

A DA é uma doença de apresentação clínica heterogênea, o que complica a investigação de sua imunopatogênese e obtenção de dados epidemiológicos. Alguns estudos demonstraram que a DA tem se apresentado com maior frequência entre as mulheres, principalmente na adolescência e na idade adulta (ODHIAMBO; WILLIAMS; CLAYTON; ROBERTSON *et al.*, 2009; PESCE; MARCON; CAROSSO; ANTONICELLI *et al.*, 2015; SANDSTRÖM; FAERGEMANN, 2004).

A DA geralmente se apresenta em 3 fases clínicas diferentes: a fase aguda é caracterizada por erupções vesiculares, exsudativa e com crostas), a fase subaguda apresenta pápulas e placas secas, escamosas e eritematosas, enquanto na fase crônica o tecido apresenta sinais de liquenificação e espessamento da epiderme pela coceira repetidamente. Geralmente as lesões estão localizadas nas superfícies flexurais do corpo, pescoço anterior e lateral, pálpebras, testa, face, punhos, dorso dos pés e mãos, podendo atingir até 90% da superfície corporal (BERKE; SINGH; GURALNICK, 2012; WEIDINGER; BECK; BIEBER; KABASHIMA *et al.*, 2018).

A fisiopatologia da DA envolve uma interação complexa entre predisposição genética, disfunção da barreira epidérmica, fatores ambientais, desregulação

imunológica, anormalidades do microbioma da pele e do sistema neuroimune, indicadas por uma ampla variedade de manifestações clínicas, como prurido, xerose (ressecamento da pele), lesões eczematosas com perda transepidérmica de água e interrupção da função de barreira da pele (LANGAN; IRVINE; WEIDINGER, 2020; LI; ZHANG; ZHANG; GUO *et al.*, 2021; SALIMIAN; SALEHI; AHMADI; EMAMVIRDIZADEH *et al.*, 2022).

1.1.2 Predisposição genética

Existem 2 principais fatores de risco para o desenvolvimento de DA: 1) história familiar de doença atópica e 2) defeito genético no gene da filagrina (FLG). O histórico familiar de doença atópica um forte preditor para o desenvolvimento da DA, pois filhos cujos pais possuem histórico de doenças alérgicas apresentam maior probabilidade de desenvolver a DA (TORRES, T.; FERREIRA, E. O.; GONÇALO, M.; MENDES-BASTOS, P. *et al.*, 2019; WADONDA-KABONDO; STERNE; GOLDING; KENNEDY *et al.*, 2004). Quando apenas um dos pais tem DA, a chance dos filhos desenvolverem a doença aumenta 3 vezes e, quando ambos apresentam DA o risco pode ser 5 vezes maior (TORRES, T.; FERREIRA, E. O.; GONÇALO, M.; MENDES-BASTOS, P. *et al.*, 2019), com maior predição pelo histórico materno (RUIZ; KEMENY; PRICE, 1992).

A pesquisa do genoma identificou 31 loci cromossômicos diferentes contendo genes associados a susceptibilidade à DA (PATERNOSTER; STANDL; WAAGE; BAURECHT *et al.*, 2015), cujos genes mais importantes estão relacionados a proteínas estruturais e funcionais da epiderme e codificam proteínas que regulam a resposta imune inata e adquirida (NEDOSZYTKO; RESZKA; GUTOWSKA-OWSIK; TRZECIAK *et al.*, 2020).

O gene FLG é o determinante genético mais estudado na DA, codificando a filagrina, uma importante proteína na diferenciação epidérmica, que desempenha um papel fundamental na função de barreira da pele (BIEBER, 2008). Mutações nesse gene constituem fator de risco para o desenvolvimento da DA (BROWN; IRVINE, 2008), levando a deficiência do fator de hidratação natural (FHN) e o quadro clínico de xerose, além de provocar uma disfunção da barreira epidérmica, permite o aumento da penetração de alérgenos e o desenvolvimento de uma resposta dominante de perfil Th2 (KEZIC; KEMPERMAN; KOSTER; DE JONGH *et al.*, 2008; O'REGAN; SANDILANDS;

MCLEAN; IRVINE, 2009; SCHARSCHMIDT; MAN; HATANO; CRUMRINE *et al.*, 2009).

Essas mutações FLG são comuns principalmente entre caucasianos e estão associadas à forma grave e persistente da doença. Aproximadamente 10% dos descendentes de europeus apresentam uma mutação que leva a perda de função do gene, reduzindo em 50% a expressão da filagrina (MCLEAN; IRVINE, 2012).

1.1.3 Barreira epidérmica

A pele é um órgão de extrema importância no contexto de DA, pois é capaz de responder aos danos teciduais em estados homeostáticos ou patológicos. A resposta imunológica da pele a um antígeno, molécula com potencial para eliciar uma resposta imune, envolve pelo menos quatro elementos. O primeiro deles é a barreira física, representada pela epiderme e funciona como uma espécie de biosensor para o ambiente externo (KUO; YOSHIDA; DE BENEDETTO; BECK, 2013).

O segundo elemento é a barreira química composta por uma variedade de moléculas, incluindo os peptídeos antimicrobianos (PAMs), inibidores de protease, membros da família S100 e produtos de degradação da FLG. A filagrina é um peptídeo que reside no estrato córneo e é progressivamente degradada por enzimas de modificação pós-traducionais, que em associação a aminoácidos hidrofílicos, seus metabólitos e vários íons formam o FHN. O FHN é essencial para a manutenção do pH da pele, regulando eventos bioquímicos chave, como a atividade de proteases, a permeabilidade da barreira e defesa antimicrobiana cutânea (KUO; YOSHIDA; DE BENEDETTO; BECK, 2013; O'REGAN; SANDILANDS; MCLEAN; IRVINE, 2008).

O terceiro elemento é o microbioma da pele, também conhecido como microbioma, que exerce um papel *in situ* de competição com bioagentes patogênicos. E o último nível de proteção é representado pela barreira imunológica envolvendo a imunidade inata e adaptativa (KUO; YOSHIDA; DE BENEDETTO; BECK, 2013).

A epiderme é formada por várias camadas que funcionam como uma barreira para evitar a perda de água e proteger o corpo de substâncias estranhas, como microrganismos e alérgenos (SALIMIAN; SALEHI; AHMADI; EMAMVIRDIZADEH *et al.*, 2022). É classificada como um epitélio escamoso estratificado queratinizado, composto por células

denominadas de queratinócitos. Os queratinócitos passam por um processo de diferenciação e queratinização se diferenciando em camadas até a superfície da pele. Dessa maneira, a epiderme é formada pelo estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e, mais externamente, o estrato córneo. Em cada uma dessas camadas os queratinócitos apresentam características morfológicas e bioquímicas diferentes (LEE; LEE; WU, 2017).

O estrato basal é a camada mais profunda da epiderme, composta por queratinócitos basais e melanócitos (células responsáveis pela síntese do pigmento da pele) e células imunes como as células de Langerhans (que atuam como células apresentadoras de antígenos), ativando células T auxiliares (CD4+) e T citotóxicas (CD8+) (BRODELL; ROSENTHAL, 2008). É no estrato basal que ocorre a síntese de queratinas 5, 10 e 14, além da filagrina, involucrina e lorícina. As três últimas proteínas estão associadas ao envelope cornificado, uma camada circundante de corneócitos, que está localizada no estrato córneo (DANSO; VAN DRONGELEN; MULDER; VAN ESCH *et al.*, 2014). Na pele lesional da DA a regulação negativa de involucrina, lorícina e filagrina está associada à disfunção da barreira cutânea (FURUE, 2020).

O estrato córneo é uma estrutura metabolicamente ativa que interage com as camadas subjacentes da epiderme, desempenhando um papel fundamental no reparo e cicatrização de feridas (EYERICH; EYERICH; TRAILD-HOFFMANN; BIEDERMANN, 2018). Os queratinócitos são unidos por *tight junctions* (TJ) e cercada por uma matriz de lipídeos, localizada nos espaços intercelulares entre corneócitos (DE BENEDETTO; RAFAELS; MCGIRT; IVANOV *et al.*, 2011; ELIAS; FEINGOLD, 1992; YANG; SEOK; KANG; CHO *et al.*, 2020).

TJ são montagens macromoleculares de proteínas presentes nas membranas celulares dos queratinócitos. Essas estruturas atuam como uma segunda barreira física na epiderme, controlando seletivamente a permeabilidade celular de materiais solúveis (FARQUHAR; PALADE, 1963; YANG; SEOK; KANG; CHO *et al.*, 2020). As proteínas de TJ como ZO-1, ZO-2, ZO-3, AF-7 e cingulina (ANDERSON; VAN ITALLIE, 1995; DENKER; NIGAM, 1998) estão localizadas no citoplasma enquanto ocludinas e claudinas são proteínas transmembranares (FURUSE; HIRASE; ITOH; NAGAFUCHI *et al.*, 1993; PELTONEN; RIEHOKAINEN; PUMMI; PELTONEN, 2007) envolvidas na adesão das TJ (VAN ITALLIE; ANDERSON, 1997).

Indivíduos com DA apresentam uma expressão de TJs alterada, resultando em uma função de barreira epitelial deficiente. Adicionalmente, alguns alérgenos podem romper essas junções e aumentar a permeabilidade epitelial, apresentando-se como uma rota potencial para a penetração de alérgenos (DE BENEDETTO; RAFAELS; MCGIRT; IVANOV *et al.*, 2011).

A disfunção de barreira epidérmica observada em pacientes com DA pode ser mediada por mecanismos primários como as mutações e polimorfismos no gene FLG bem como e/ou mecanismos secundários, representado pelos ciclos de coceiras e arranhões, rompendo mecanicamente a barreira epitelial ou diminuição da expressão de lipídeos ou proteínas estruturais epidérmicas em resposta imune mediada por citocinas tipo 2 (COLE; KROBOTH; SCHURCH; SANDILANDS *et al.*, 2014; SELTMANN; ROESNER; VON HESLER; WITTMANN *et al.*, 2015).

Algumas anormalidades em genes relacionados à barreira epidérmica já foram descritas incluindo mutações, polimorfismos e perda de função da filagrina, uma molécula chave para o entendimento do funcionamento da barreira da pele (PALMER; IRVINE; TERRON-KWIATKOWSKI; ZHAO *et al.*, 2006). A filagrina é responsável por agregar filamentos de queratina em feixes compactos e modificar a composição de queratinócitos e a camada celular granular (THYSSEN; KEZIC, 2014) e deficiências em sua formação e processamento resulta em uma formação desorganizada das folhas epidérmicas que contribuem para a penetração de alérgenos e irritantes na pele (YOO; OMORI; GYARMATI; ZHOU *et al.*, 2005).

Na DA, defeitos no metabolismo da pró-filagrina, uma proteína precursora da filagrina, e menor expressão de claudina-1 (proteína localizada nas TJs) levam à predisposição a infecções e a inflamação cutânea (ADDOR; TAKAOKA; RIVITTI; AOKI, 2012; BATISTA; PEREZ; ORFALI; ZANIBONI *et al.*, 2015). Além disso, a disponibilidade reduzida de lipídeos e metabólitos de filagrina, como o FHN, resultam em alterações na hidratação e no pH da pele (THYSSEN; KEZIC, 2014).

As principais classes de lipídeos presentes no estrato córneo humano são as ceramidas, ácidos graxos e colesterol. Os lipídios presentes na pele, também desempenham um papel na DA mostrando que alterações na sua distribuição e comprimento de cadeia estão relacionadas com defeitos na barreira cutânea (JANSSENS; VAN SMEDEN; GOORIS; BRAS *et al.*, 2012).

Em virtude de suas características estruturais específicas, as ceramidas são essenciais para a organização e função da barreira cutânea. No entanto, baixos níveis de ceramidas têm sido relatados no envelope córneo da pele de pacientes com DA (SATOR; SCHMIDT; HONIGSMANN, 2003; VAN SMEDEN; BOUWSTRA, 2016), gerando um aumento do pH e, conseqüentemente a maior atividade das serinoproteases, que promovem a inativação e degradação de enzimas para a síntese de ceramidas (ELIAS; WAKEFIELD, 2014).

Indivíduos com DA apresentam corneócitos de tamanho reduzido, envelope cornificado defeituoso com redução da compactação e de lipídeos intercelulares (CORK; DANBY; VASILOPOULOS; HADGRAFT *et al.*, 2009; GUTTMAN-YASSKY; SUÁREZ-FARIÑAS; CHIRICOZZI; NOGRALES *et al.*, 2009), além de níveis de lactato e potássio potencialmente diminuídos com o aumento de ceramidas de cadeia curta, o que provoca deficiências da barreira epitelial e perda de água na pele (SALIMIAN; SALEHI; AHMADI; EMAMVIRDIZADEH *et al.*, 2022).

O aumento do pH da pele aumenta a atividade das serinas proteases e calicreínas, levando à degradação dos corneodesmosomos e a perda da aderência intercelular (KAWASAKI; NAGAO; KUBO; HATA *et al.*, 2012; LANDHEER; GIOVANNONE; MATTSON; TJABRINGA *et al.*, 2013; MORIZANE; YAMASAKI; KAJITA; IKEDA *et al.*, 2012). As alterações do estrato córneo resultam em perda de água transepidérmica, aumentando a absorção de antígenos, e assim, contribuindo para a hiperreatividade cutânea, que é característica da doença (PENG; NOVAK, 2015).

Além das modificações acima mencionadas, os indivíduos com DA também apresentam um desequilíbrio do microbioma comensal natural da pele, promovendo a colonização de bactérias patogênicas, como o *Staphylococcus aureus* em lesões cutâneas, agravando o quadro clínico da DA (ISHIKAWA; NARITA; KONDO; HOTTA *et al.*, 2010; SALIMIAN; SALEHI; AHMADI; EMAMVIRDIZADEH *et al.*, 2022).

1.1.4 Fatores ambientais e hábitos de vida

A DA é uma doença de etiologia heterogênea, desencadeada por fatores ambientais em indivíduos geneticamente suscetíveis. Sendo assim, as variações de prevalência de DA em adultos poderiam ser justificadas pelas diferenças de exposição a fatores ambientais. Neste contexto, de acordo com a hipótese da higiene, os antígenos

ambientais aos quais os indivíduos são expostos nos primeiros anos de vida são fundamentais para o desenvolvimento do sistema imunológico. Com a industrialização e aumento da prática de banho e higienização, especialmente nos países mais desenvolvidos a diminuição dessa exposição precoce, aumenta a propensão de desenvolvimento de doenças atópicas, como a DA (STRACHAN, 1989).

Ainda não está totalmente claro como os fatores ambientais contribuem para a DA nos adultos. Sabe-se que os fatores de risco ambientais são relacionados a condições geográficas, tais como clima e exposição ultravioleta, poluição do ar, contato com ambientes de fazenda, bem como fatores socioeconômicos, fumo, estresse e consumo de álcool (SACOTTE; SILVERBERG, 2018).

Pode ser desencadeada também por alérgenos alimentares, cosméticos, fragrâncias, clima, entre outros. Climas muito quentes ou frios representam um problema para os pacientes com DA, estimulando a sudorese ou o ressecamento da pele, respectivamente, iniciando o prurido. A exposição a alérgenos ambientais, como ácaros, pólen, mofo, fumaça de cigarro e pelos de animais também podem exacerbar os sintomas da DA. Essa exposição constitui a principal causa do início dos sintomas, devendo esta ser evitada para o controle da doença (AVENA-WOODS, 2017).

1.1.5 Imunopatogênese

Estímulos mecânicos associados aos imunológicos moldam as lesões histopatológicas características da DA crônica. Apesar de haver uma consistente caracterização clínica da DA, pela presença de lesões de pele intensamente pruriginosas, pápulas eritematosas associadas à escoriação e exsudação, a patogênese da DA ainda não está totalmente elucidada. Entretanto, vários estudos mostram que a doença está correlacionada com a disfunção da barreira da pele, além de reação exagerada e anormal do sistema imunológico contra antígenos externos e/ou autoantígenos ou mesmo a sensibilização mediada pela imunoglobulina E (IgE) para alérgenos ambientais, que culminam em intensa eosinofilia, ativação crônica de macrófagos, elevada secreção de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), prostaglandina E2 (PGE2), interleucinas 4, 5, 10, 13, 17 e 22, ativação e liberação de histamina por basófilos e mastócitos (LEUNG, 2013; ORFALI; SHIMIZU; TAKAOKA; ZANIBONI *et al.*, 2013). Além disso, há a contribuição de diferentes subconjuntos de células T e a interação

com outras células inflamatórias e queratinócitos como componentes importantes para a patogênese da doença (BIEBER, 2010).

No estágio não lesional, a pele com DA apresenta alta perda transepidérmica de água, baixa secreção de sebo e sinais de infiltrado inflamatório, associados à disfunção da barreira epitelial, contribuindo para o aumento da penetração de alérgenos proteicos ou outras substâncias bioativas (WOLLENBERG; RÄWER; SCHAUBER, 2011).

A exposição permanente e ativa a esses alérgenos, resultam em erupção cutânea e coceira (prurido), que levam ao desenvolvimento de lesões crônicas de pele, provocando a remodelação do tecido e a formação de placas com hiperplasia (liquenificação), aumento da deposição de colágeno na derme e pápulas fibróticas secas (GALLEGOS-ALCALÁ; JIMÉNEZ; CERVANTES-GARCÍA; SALINAS, 2021). Por fim, a epiderme já danificada e os queratinócitos ativados induzem ao quadro de disbiose com uma resposta inflamatória, clinicamente caracterizada pelo prurido intenso, o que contribui ainda mais para a ruptura da barreira epitelial (BAUTISTA; WILSON; HOON, 2014; DAINICHI; KITO; OTSUKA; NAKAJIMA *et al.*, 2018).

1.1.5.1 Resposta imune inata

A imunidade inata se constitui de mecanismos celulares e bioquímicos de defesa primária e, na pele exercem um importante papel na ativação e modulação dos diferentes compartimentos do sistema imunológico, com efeitos sistêmicos (EGAWA; KABASHIMA, 2011; HU; LIU; LIU; MU *et al.*, 2020; YUKI; YOSHIDA; AKAZAWA; KOMIYA *et al.*, 2011). A exemplo, os queratinócitos, que compõem a estrutura da pele, podem produzir uma série de mediadores que ativam a resposta celular, modulando a resposta imune através do reconhecimento de sinais de perigo, que por vezes estão associados à ruptura da barreira epitelial e a invasão microbiana na pele, estimulando a produção de IL-6, IL-18, IL-23, fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), peptídeos antimicrobianos (AMPs), promovendo a ativação, diferenciação e recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão (CHIEOSILAPATHAM; KIATSURAYANON; UMEHARA; TRUJILLO-PAEZ *et al.*, 2021).

A ativação das células do sistema imunológico pode ocorrer mediante a ativação de múltiplos receptores, incluindo receptores de reconhecimento padrão da família de

receptores semelhantes ao Toll (TLR - *Toll like receptors*), receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD - *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like receptors*) e receptores de lectina tipo C. Todos esses elementos podem ser estimulados por microrganismos ou danos teciduais, induzindo a liberação de AMPs, citocinas e quimiocinas que agem em conjunto como um mecanismo de defesa contra a penetração de microrganismos através do aumento da força de adesão celular mediada por *tight junctions* (YUKI; YOSHIDA; AKAZAWA; KOMIYA *et al.*, 2011).

Os AMPs são liberados por queratinócitos e neutrófilos após dano epitelial, como mecanismo de defesa imediata contra microrganismos invasores, funcionando como antibióticos e, desempenhando, portanto, um papel importante na imunidade inata cutânea (SCHAUBER; GALLO, 2008; WOLLENBERG; RÄWER; SCHAUBER, 2011).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) reconhecem, processam e transportam os antígenos até os linfonodos, onde se inicia uma resposta imune mais específica (CHIEOSILAPATHAM; KIATSURAYANON; UMEHARA; TRUJILLO-PAEZ *et al.*, 2021). Após a exposição a um antígeno proteico, as células dendríticas (DCs), no papel de APCs, estimulam a proliferação de células T induzindo diferentes perfis de células T efetoras. Diferentes subconjuntos de DCs desempenham papéis diferentes durante as fases da DA (NOVAK, N., 2012; RISSOAN; SOUMELIS; KADOWAKI; GROUARD *et al.*, 1999). As células dendríticas presentes na pele podem ser divididas em imunofenótipos diferentes: a) Células de Langerhans (LCs), b) células dendríticas epidérmicas inflamatórias (IDECs) e c) células dendríticas plasmocitoides (PDCs) (WOLLENBERG; WAGNER; GÜNTHER; TOWAROWSKI *et al.*, 2002).

As LCs são DCs da epiderme não lesionada, definidas como APCs que expressam moléculas de CD1a e MHC II. Os IDECs apresentam maior expressão das moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 do que as LCs, reforçando seu papel na apresentação antigênica da pele (WOLLENBERG; RÄWER; SCHAUBER, 2011). Nas lesões de DA, acredita-se que os altos níveis de GM-CSF, IL-4 e IL-13 estimulem a diferenciação de monócitos do sangue periférico em IDECs enquanto migram. Estudos *in vitro* demonstraram que após desafio alérgico as células dendríticas do subtipo inflamatório aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (NOVAK, NATALIJA, 2012; YOSHIDA; KUBO; FUJITA; YOKOUCHI *et al.*, 2014).

INTRODUÇÃO

Entre as células presentes na pele, as PDCs representam o tipo celular mais importante para iniciar a resposta imune do tipo Th2, pois expressam em sua superfície o receptor da porção Fc de IgE de classe I (FcεRI), que apresenta alta afinidade para IgE. O aumento da expressão desse receptor está relacionado com a gravidade das lesões cutâneas (NOVAK, N., 2012; RISSOAN; SOUMELIS; KADOWAKI; GROUARD *et al.*, 1999).

Os mastócitos são as células importantes para mediar reações de hipersensibilidade de tipo I, sendo amplamente encontradas nas lesões da DA. Essas células são ativadas por IgE, que por meio da ligação ao seu receptor FcεRI, promove a liberação de heparina, histamina, proteína básica principal, prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas e quimiocinas, além de importantes citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TNFα, TGFβ, IFNγ, IL-31, IL-17 e IL-22. Além disso, mastócitos ativados também produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8, respectivamente mediando a inflamação alérgica e promovendo a quimiotaxia de neutrófilos para sítios inflamatórios (ANDO; MATSUMOTO; NAMIRANIAN; YAMASHITA *et al.*, 2013; BRANDT; SIVAPRASAD, 2011; KAWAKAMI; ANDO; KIMURA; WILSON *et al.*, 2009; MICAN; ARORA; BURD; METCALFE, 1992; MÖLLER; LIPPERT; LESSMANN; KOLDE *et al.*, 1993; SALAMON; SHOHAM; GAVRIELI; WOLACH *et al.*, 2005).

O recrutamento e ativação de basófilos também são observados na DA. Os dados disponíveis mostram que essas células podem ser ativadas por citocinas secretadas pelos queratinócitos, como a IL-33 e produzem IL-4 auxiliando na ativação e recrutamento de ILC2s e células Th2. Os basófilos podem apresentar funções benéficas e prejudiciais na DA. A secreção de IL-4 pelos basófilos promovem a hiperplasia epidérmica e a disfunção da barreira cutânea durante a inflamação. Por outro lado, os basófilos podem inibir o acúmulo de células pró-inflamatórias na pele e promovem a expansão de macrófagos tipo M2, contribuindo para resolução da inflamação e estimulando a expressão de genes pró-barreira (IMAI; YASUDA; NAGAI; KUSAKABE *et al.*, 2019; PELLEFIGUES; NAIDOO; MEHTA; SCHMIDT *et al.*, 2021).

Os monócitos humanos são considerados precursores de macrófagos e DCs, mediante diferenciação em um ambiente inflamatório. (CHORRO; SARDE; LI; WOOLLARD *et al.*, 2009; HASHIMOTO; CHOW; NOIZAT; TEO *et al.*, 2013). No

estado estacionário, os monócitos que migrados do sangue para o tecido mantêm seu caráter monocítico e apresentador de antígenos para células do T nos linfonodos. Na DA, a sinalização atenuada de IFN γ e TGF β , além de baixa responsividade de monócitos, contribuem para promover um perfil de resposta tipo Th2, principalmente redução de citocinas do perfil Th1 (GROS; PETZOLD; MAINTZ; BIEBER *et al.*, 2011; PENG; MAINTZ; ALLAM; NOVAK, 2013).

O aumento nos níveis de eosinófilos no sangue está associado com a gravidade da doença (KIEHL; FALKENBERG; VOGELBRUCH; KAPP, 2001). Além de IL-4 e IL-10, a proliferação, migração e ativação local de eosinófilos, induzidos por IL-5, são características que suportam a imunidade humoral e as funções destas células na DA (LIU; GOODARZI; CHEN, 2011).

Os eosinófilos desempenham um papel de imunorregulador, função que é influenciada pela liberação de várias citocinas e quimiocinas, algumas dentre as quais são quimioatrantes de linfócitos como a IL-16, presente em altos níveis em pacientes adultos com DA (MASUDA; KATOH; OKUDA; KISHIMOTO, 2003). Além disso, citocinas de perfil Th2, em lesões agudas, podem estimular os eosinófilos a produzirem IL-12, promovendo uma mudança do perfil para uma resposta tipo Th1 nas lesões crônicas (GREWE; CZECH; MORITA; WERFEL *et al.*, 1998).

Existem evidências que os eosinófilos também estão envolvidos no reparo tecidual e nos processos fibróticos da inflamação alérgica. Essas células estimulam a síntese de colágeno através da secreção de TGF β . Um estudo realizado na pele de indivíduos com DA revelou que TGF β e IL-13, liberados por eosinófilos, contribuem para os eventos de reparo e remodelação (LIU; GOODARZI; CHEN, 2011; PHIPPS; YING; WANGOO; ONG *et al.*, 2002). Dessa maneira, os eosinófilos contribuem na defesa contra a invasão de microrganismos nos casos de deficiência da barreira cutânea, regulando a resposta imune e/ou contribuindo para o remodelamento tecidual.

O estágio inicial das lesões da DA apresenta uma forte resposta das células linfoides inatas tipo 2 (ILC2s). Os queratinócitos participam produzindo citocinas como IL-33, IL-25 (IL-17E) e linfopoetina estromal tímica (TSLP), que ativam ILC2s, basófilos, mastócitos e as respostas imunes mediadas por células Th2. Após a ativação dos fatores de transcrição STAT6, ROR α ou GATA3, as ILC2s iniciam a produção de IL-5, IL-9 e IL-13, estimulando células Th2 secretarem IL-4, IL-13 e IL-31 e provocando

um acúmulo de eosinófilos e mastócitos nas lesões de pele (ROEDIGER; KYLE; LE GROS; WENINGER, 2014; SALIMI; BARLOW; SAUNDERS; XUE *et al.*, 2013).

A sinalização via IL-33 induz a produção de anfiregulina que estimula a migração de ILC2s, enquanto a E-caderina inibe a produção de IL-5 e IL-13 pelas ILC2s. No entanto, sua deficiência de E-caderina está associada à deficiência de filagrina, favorecendo o acúmulo de ILC2s na inflamação aguda de pele e o desenvolvimento da DA (SALIMI; BARLOW; SAUNDERS; XUE *et al.*, 2013; SCHWARTZ; MORAN; SAUNDERS; KASZLIKOWSKA *et al.*, 2019)

As ILC2s estão aumentadas em lesões de pacientes com dermatite atópica bem como em modelos experimentais (KIM; SIRACUSA; SAENZ; NOTI *et al.*, 2013; SALIMI; BARLOW; SAUNDERS; XUE *et al.*, 2013). As análises transcriptômicas mostraram que ILC2s de pele também podem ser ativadas por IL-18 (RICARDO-GONZALEZ; VAN DYKEN; SCHNEIDER; LEE *et al.*, 2018) e em sua ausência ocorre redução do número de eosinófilos nas lesões (CHEN; NIU; GAO; MA *et al.*, 2020). Adicionalmente, a IL-4 derivada de basófilos é capaz de estimular a inflamação cutânea, aumentando a proliferação de ILC2s que expressam o receptor IL-4R α de maneira dependente de IL-4 (KIM; WANG; SIRACUSA; SAENZ *et al.*, 2014; MASHIKO; MEHTA; BISSONNETTE; SARFATI, 2017).

Além das ILC2s, as células Sca1+IL-10+TGF β +, descritas como ILC reguladoras (ILCregs), embora ainda pouco compreendidas, também parecem desempenhar um papel importante na patogênese da DA, visto que são encontradas em abundância da pele que exibe melhoras dos sinais clínicos da DA, sintetizando TGF β e IL-10 (NATSUME; AOKI; AOYAMA; SENDA *et al.*, 2020).

1.1.5.2 Resposta imune adaptativa

A imunidade inata e adaptativa tem um papel pivotante no desenvolvimento e manutenção da DA. A rigor, a resposta imunológica envolve uma fina comunicação entre células dendríticas, queratinócitos, células T e B. As DCs atuam como um elo entre a resposta imune inata e adaptativa, ampliando a resposta imune alérgica, atuando na apresentação de antígenos que ativam as células T (KADER; AZEEM; JWAYED; ALSHEHHI *et al.*, 2021; NOVAK; KOCH; ALLAM; BIEBER, 2010) e os queratinócitos

INTRODUÇÃO

regulam a diferenciação de células T efetoras na DA através da secreção de citocinas (HOMEY; STEINHOFF; RUZICKA; LEUNG, 2006; RERKNIMITR; OTSUKA; NAKASHIMA; KABASHIMA, 2017).

Os linfócitos T são essenciais para a promoção da inflamação, tal qual a regulação da resposta imune e inflamação por meio da secreção de citocinas efetoras específicas. Os linfócitos T CD4⁺ são subdivididos em células T *helper* (Th) e T regulatória (Treg), conforme o perfil de produção de citocinas. Em geral, as células Th são importantes para o desenvolvimento da DA alérgica e a manutenção de respostas imunes enquanto as células Treg são responsáveis por promoverem a homeostase imunológica e tolerância periférica e atenuar as respostas imunes (NISHI; YAMAMOTO; OU; MURO *et al.*, 2008).

Na DA, a ruptura da barreira epitelial ativa células dendríticas epidérmicas inflamatórias da pele, células linfoides inatas e células de Langerhans e estimula a produção e secreção de citocinas que estimulam a resposta Th2, como incluindo linfopietina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33, conhecidas como alarminas (WEIDINGER; BECK; BIEBER; KABASHIMA *et al.*, 2018). Os indivíduos com doenças atópicas expressam constitutivamente esses sinais precoces em queratinócitos e outras células epiteliais, que atuam em células inatas, como células dendríticas, mastócitos, basófilos e células linfoides inatas tipo 2 (ILC2s) (ROAN; OBATA-NINOMIYA; ZIEGLER, 2019).

Imunologicamente, a DA é caracterizada como uma doença alérgica mediada por células Th2 que produzem IL-4, IL-5, IL-13 e IL-31, resultando na troca de classe IgE em células B e produção de IgE específica de antígeno por meio do transdutor de sinal e ativador da via de transcrição (STAT) (BIEBER, 2010; GANDHI; BENNETT; GRAHAM; PIROZZI *et al.*, 2016).

Os alérgenos conseguem penetrar mais facilmente na pele em indivíduos com DA que, geneticamente já apresentam uma barreira cutânea disfuncional (ELIAS; HATANO; WILLIAMS, 2008; SALIMIAN; SALEHI; AHMADI; EMAMVIRDIZADEH *et al.*, 2022). Num ciclo contínuo, IL-4 e IL-13 secretadas pelas células Th2 podem romper ainda mais a barreira epitelial, agravando a resposta inflamatória, reduzindo a expressão de genes de importantes proteínas de barreira como a filagrina, loricrina e involucrina e

suprimindo a diferenciação de queratinócitos (HOWELL; KIM; GAO; GRANT *et al.*, 2009; KIM; LEUNG; BOGUNIEWICZ; HOWELL, 2008).

Em conjunto, ocorre a inibição da produção de AMPs predispondo o sítio à infecções, diminuindo a síntese de lipídeos no estrato córneo e induzindo a espongiose (anormal acúmulo de líquido entre as células). A IL-4 e IL-13 também podem estimular a produção de TSLP ampliando a resposta Th2 na DA (KIM; KIM; CHO; PARK, 2016). Em regra, a IL-5 está envolvida na ativação e sobrevivência de eosinófilos enquanto a IL-31 está relacionada aos sintomas de prurido, um dos principais sintomas da fase aguda, além da alopecia, incluindo as formas mais graves da DA (RAAP; WEIßMANTEL; GEHRING; EISENBERG *et al.*, 2012). A produção de IL-31 ativa fibras aferentes nos neurônios epiteliais, mediada pelo receptor IL-31RA (CEVIKBAS; WANG; AKIYAMA; KEMPKES *et al.*, 2014; MAIER; MITTERMEIR; ESS; NEUPER *et al.*, 2015).

A desregulação dos subconjuntos celulares clássicos (Th1, Th2 e Th17), caracterizada pelo padrão típico de expressão precoce de citocinas Th2 com transição para um fenótipo Th1 na progressão da doença, tem sido observado na imunopatogênese da DA (NISHI; YAMAMOTO; OU; MURO *et al.*, 2008). Um estudo com biópsias sequenciais de pacientes com DA expostos a ácaros, um importante aeroalérgeno, demonstraram uma resposta imunológica bifásica com alternância de perfil Th2 para Th1 pela secreção de IL-12, TNF α e IFN γ em fases mais avançadas da doença (GREWE; WALTHER; GYUFKO; CZECH *et al.*, 1995; LEUNG, 2013; SROKA-TOMASZEWSKA; TRZECIAK, 2021). Além disso, a participação de células Th17 ativadas por IL-1 β , IL-6 e TGF β na fase inicial da doença, está associada à inflamação aguda da pele (CESARE; MEGLIO; NESTLE, 2008).

Esse perfil celular se caracteriza pela produção de IL-17A, IL-25 (IL-17E) e IL22, nas quais foram bem caracterizadas na DA. A IL-17 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativando células Th2 a produzirem IL-4, (NAKAJIMA; KITO; EGAWA; NATSUAKI *et al.*, 2014; RERKNIMITR; OTSUKA; NAKASHIMA; KABASHIMA, 2017).

A IL-25 (IL-17E), estimula a ativação de células Th2, em associação às células dendríticas ativadas por TSLP, contribuindo também para a redução da síntese de filagrina pelos queratinócitos (HVID; VESTERGAARD; KEMP; CHRISTENSEN *et al.*,

2011; WANG; ANGKASEKWINAI; LU; VOO *et al.*, 2007). Em relação ao balanço Th1/Th17, ainda existem poucas informações sobre seus efeitos nos queratinócitos na DA crônica. Sabe-se que o IFN γ inibe a expressão de claudina-1 através da via JAK/STAT, contribuindo para a perda de função das TJ na pele, que pode ser interessantemente ser revertida por IL-17A (MIZUTANI; TAKAGI; NAGATA; INOUE, 2021).

A mudança de fase inflamatória aguda para crônica ocorre quando IDECs e/ou eosinófilos aumentam a produção de IL-12 e IL-18, levando à ativação de células Th1, cuja liberação de IFN γ induz a apoptose de queratinócitos e a liberação de IL-22 provoca alterações estruturais da pele, como o aumento da espessura (MANDLIK; MANDLIK, 2021).

O padrão de quimiocinas secretadas pelas DCs são distintos para fases aguda e crônica bem como na pele com DA não lesionada. Na inflamação tecidual ocorre um aumento da secreção de CCL17, CCL22 na pele, estimulando o recrutamento de IDECs e infiltrado de células T (GROS; BUSSMANN; BIEBER; FÖRSTER *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* com células cutâneas indicam que células dendríticas não estimuladas de pacientes com DA são capazes de conduzir respostas imunes Th1, Th2 ou Th17, enquanto o microambiente local impacta na sua polarização de células T *in vivo* (FUJITA; SHEMER; SUÁREZ-FARIÑAS; JOHNSON-HUANG *et al.*, 2011).

As células Th22 também estão associadas à gravidade da doença, especialmente em indivíduos adultos (CZARNOWICKI; ESAKI; GONZALEZ; MALAJIAN *et al.*, 2015). A diferenciação de células T *naive* em células Th22 ocorre por via dependente de IL-6 e TNF produzindo IL-22 pela ativação de JAK-STAT (RAMIREZ; BREMBILLA; SORG; CHICHEPORTICHE *et al.*, 2010). Na DA, IL-22 aumenta a produção de AMPs, inibe a expressão de FLG, aumenta a mobilidade celular e migração de queratinócitos, contribuindo para a hiperplasia epidérmica (GUILLOTEAU; PARIS; PEDRETTI; BONIFACE *et al.*, 2010; GUTOWSKA-OWSIK; SCHAUPP; SALIMI; TAYLOR *et al.*, 2016).

As células Treg, divididas em Treg de “ocorrência natural” CD4-FOXP3⁺ e Treg adaptativas que, após a ativação, secretam de altos níveis de IL-10 ou TGF- β , são cruciais para a manutenção da tolerância periférica a antígenos próprios (AKDIS; BLASER; AKDIS, 2005). Mutações em seu fator de transcrição FOXP3, resultam em desregulação imune, com hiperprodução de IgE, alergia alimentar e eczema, o que sugere um possível

papel dessas células na DA (TORGERSON; OCHS, 2007). No entanto, o fato é que pouco se sabe sobre o recrutamento e o papel das Tregs na DA.

A exemplo, um estudo com células Treg IL-10⁺ foram isoladas da pele lesional, apesar da ausência de células Tregs CD25⁺ FOXP3⁺, mas outros trabalhos demonstraram a presença deste último perfil celular nas lesões (CAPRONI; ANTIGA; TORCHIA; VOLPI *et al.*, 2007; FUJIMURA; OKUYAMA; ITO; AIBA, 2008; VERHAGEN; AKDIS; TRAILD-HOFFMANN; SCHMID-GRENDELMEIER *et al.*, 2006).

O conceito que células T podem ser influenciadas pelo ambiente inflamatório não é recente. A plasticidade dependente do microambiente torna-se cada vez mais evidente e, sendo aplicável também para as Tregs (AGRAWAL; WISNIEWSKI; WOODFOLK, 2011). A redução da expressão de FOXP3 resulta em conversão de Tregs em células Th2 e pode ocorrer mesmo em um ambiente de polarização Th1 (WAN; FLAVELL, 2007). Ainda existem evidências que essa conversão é bidirecional, células Th2 podem ser novamente diferenciadas em Tregs FOXP3⁺ por TGFβ na presença de ácido retinóico e rapamicina (KIM; KIM; PARK; KIM *et al.*, 2010).

Além disso, as Tregs também podem ser convertidas em outros tipos de células T, como Th17. As células T *naive* são diferenciadas em células Th17 por TGFβ e IL-6, mas as células Tregs produtoras de TGFβ podem se diferenciar em células Th17 apenas na presença de IL-6 (XU; KITANI; FUSS; STROBER, 2007). Esses aspectos da plasticidade das células T podem ser altamente relevantes para os processos de doença na pele. Por isso, estudos fenotípicos e mecanísticos investigando as células Tregs durante as lesões e períodos de remissão da DA são necessários para esclarecer melhor o papel das Tregs nesta doença (KALEKAR; ROSENBLUM, 2019).

1.1.6 Fenótipos da DA

1.1.6.1 DA pediátrica e adulta

A prevalência da DA em adultos tem aumentado consideravelmente embora os bebês ainda sejam os mais vulneráveis para o desenvolvimento da doença (CABANILLAS; BREHLER; NOVAK, 2017). Em adultos, a DA se caracteriza pela ativação, dentre outros fatores, de células Th2/Th22 produtoras de citocinas que são identificadas na pele e no sangue, resultado da ativação de linfócitos cutâneos e

sistêmicos. Na DA pediátrica a resposta imunológica é caracterizada pela ativação de células Th17, Th9 produtoras de IL-9, por meio da produção de AMPs, IL-33 e outros marcadores da resposta imune inata como IL-1 β , IL-8 e IFN α . Além disso, no entanto, a polarização de resposta Th2 em crianças está confinada na pele, com altos níveis de IL-31 e IL-33 foram encontradas em comparação aos adultos, mas sem diferença significativa para a produção de TSLP nesses grupos (NYGAARD; HVID; JOHANSEN; BUCHNER *et al.*, 2016; WERFEL; ALLAM; BIEDERMANN; EYERICH *et al.*, 2016).

1.1.6.2 DA intrínseca e extrínseca

A classificação em DA intrínseca e extrínseca é baseada basicamente nos níveis de IgE e na exposição a fatores ambientais. A DA extrínseca ou alérgica é caracterizada pela produção elevada de IgE sérica específica a alérgenos alimentares e ambientais. Já a DA intrínseca apresenta níveis de IgE séricos normais e ausência de IgE específica a alérgenos (TOKURA, 2010).

Estima-se que 20% das mulheres com DA apresentam DA intrínseca. Alguns estudos mostram que lesões de DA de ambos os tipos apresentam maior expressão de mRNA para citocinas perfil Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13. Além disso, lesões de DA intrínseca demonstram, ainda, aumento de expressão de IFN γ e FOXP3 acompanhada de maior presença de células dos perfis Th17 e Th22 (CABANILLAS; BREHLER; NOVAK, 2017; KADER; AZEEM; JWAYED; AL-SHEHHI *et al.*, 2021).

1.1.7 Manejo e tratamento

Inúmeros fatores ambientais podem irritar a pele com DA e provocar as crises, como irritantes mecânico, como: lã, tecidos e fibras irritantes; produtos químicos, como ácidos, alvejantes, solventes, cosméticos e produtos de higiene; biológicos, como: alérgenos e; poluentes do ar, como: fumaça de tabaco, compostos orgânicos voláteis e poluição de trânsito. A identificação dos fatores desencadeantes é essencial para o manejo mais efetivo da DA e a prevenção da exposição auxilia em períodos mais longos de remissão ou eliminação de sintomas (WEIDINGER; BECK; BIEBER; KABASHIMA *et al.*, 2018).

INTRODUÇÃO

Atualmente, não existe cura para a DA, o principal objetivo do tratamento é minimizar os sintomas, melhorando a qualidade de vida do indivíduo com toxicidade mínima (LY; AMICI, 2018). O manejo da doença envolve métodos de hidratação da pele, eliminação de gatilhos e contato com alérgenos, além de farmacoterapia. Na DA leve a moderada o tratamento é feito com terapias anti-inflamatórias tópicas, como corticosteróides tópicos ou inibidores de calcineurina, para o tratamento de crises agudas e manutenção em conjunto com anti-histamínicos e tratamentos adicionais para infecções bacterianas, fúngicas e virais (EICHENFIELD; TOM; BERGER; KROL *et al.*, 2014; SIDBURY; TOM; BERGMAN; COOPER *et al.*, 2014).

A DA é uma doença crônica, inflamatória e recorrente. Por isso, é recomendável a manutenção a longo prazo em relação ao simples tratamento em resposta aos surtos. Por apresentar defeitos de barreira e sinais de inflamação constantemente, os pacientes com DA leve, moderada e grave, precisam fazer o uso de emolientes ou hidratantes mesmo em áreas não afetadas diariamente, uma vez que a hidratação reduz a perda transepidérmica de água, contribuindo para o reparo da barreira epitelial (LUCKY; LEACH; LASKARZEWSKI; WENCK, 1997; MALIYAR; SIBBALD; POPE; GARY SIBBALD, 2018).

Os corticoesteroides de uso tópico tornaram-se o principal tratamento da DA, desde a década de 1950, quando se iniciou a sua utilização da dermatologia. Nos casos de DA moderada as aplicações tópicas de corticosteroides são feitas duas ou três vezes na semana após o uso de emolientes. Os corticosteroides são categorizados de acordo com sua potência: categoria I (leve) a grupo IV (superpotentes), ao passo que, corticoides de categoria IV não são recomendados para bebês e crianças (MANDLIK; MANDLIK, 2021; NIEDNER, 2001).

A terapia anti-inflamatória tópica da DA baseia-se em três princípios fundamentais: dose adequada, intensidade suficiente e uso adequado. O uso inapropriado e a longo prazo pode causar efeitos colaterais locais, incluindo atrofia da pele, púrpura, estrias, telangiectasias, equimose, cicatrizes espontâneas, hipertricose, despigmentação e alterações acneiformes (BARNES; KAYA; ROLLASON, 2015; HAJAR; LESHEM; HANIFIN; NEDOROST *et al.*, 2015). Embora sejam incomuns, sistemicamente o uso tópico de corticoesteróides, esses fármacos podem causar supressão hipotalâmica-hipofisária-adrenal (LEVIN; GUPTA; BUTLER; CHIANG *et al.*, 2014).

A eficácia no tratamento da DA deve-se a uma variedade de mecanismos que envolvem efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e imunossupressores. Especificamente, há uma supressão de vários tipos celulares como neutrófilos, monócitos, linfócitos e LCs, bem como de citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-2, TNF e GM-CSF (DEL ROSSO; FRIEDLANDER, 2005; MAYBA; GOODERHAM, 2017). Além disso, os corticoesteroides de uso tópico também induzem a expressão de proteínas anti-inflamatórias como lipocortina, vasocortina e vasoregulina (DEL ROSSO; FRIEDLANDER, 2005; MAYBA; GOODERHAM, 2017). Por estes motivos são a terapia de primeira linha recomendada para o controle agudo da DA moderada a grave (HANIFIN; COOPER; HO; KANG *et al.*, 2004).

Os corticoesteroides comercialmente disponíveis se apresentam na forma de pomadas, cremes, loções, géis, spays e espumas. As preparações variam de acordo com a região específica do corpo afetada para tratamento. As pomadas são mais utilizadas para palmas das mãos e solas dos pés, como áreas mais secas do corpo, envolvendo tronco e extremidades. Os cremes são utilizados em diversas áreas, inclusive áreas flexurais e genitais. Espumas, spays e géis são mais indicadas para áreas com pelos e áreas oleosas (HANIFIN; COOPER; HO; KANG *et al.*, 2004; MAYBA; GOODERHAM, 2017).

Pela exposição do epitélio e conseqüente favorecimento às infecções cutâneas, aumento a susceptibilidade à colonização por *S. aureus*, na DA crônica pode ser prescrita a terapia a curto prazo com o uso de antimicrobianos tópicos, uma vez que o uso contínuo pode levar à resistência bacteriana (MALIYAR; SIBBALD; POPE; GARY SIBBALD, 2018). Ainda, o tratamento para a DA moderada a grave pode exigir estratégias sistêmicas de tratamento, como imunobiológicos, agentes imunomoduladores, imunoterapia com alérgenos, terapia anti-IgE e nos casos mais graves fototerapia e hospitalização (SIDBURY; DAVIS; COHEN; CORDORO *et al.*, 2014).

1.2 Nanotecnologia e entrega de medicamentos (*drug delivery*)

Na busca de novos avanços no âmbito da nanotecnologia, o uso de nanopartículas tem desempenhado um papel fundamental na entrega (*delivery*) de moléculas com potencial farmacêutico na pele. As nanopartículas são definidas como sistemas de partículas coloidais com dimensões entre 10-1000 nm. Essas estruturas em escala nanométrica têm sido largamente mencionadas especialmente devido ao amplo espectro

de aplicação terapêutica e a facilidade de penetração através da barreira epitelial (CHAUHAN, ITI; YASIR, MOHD; VERMA, MADHU; SINGH, ALOK PRATAP, 2020; MUKHERJEE; RAY; THAKUR, 2009).

Desde os primeiros estudos, na década de 90, com o Prof. Rainer H. Müller na Alemanha e Prof. M. Gascon na Itália, as nanopartículas de lipídicas, especialmente as nanopartículas lipídicas solidas (SLNs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), atraíram a atenção de diversos grupos de pesquisa por representarem sistemas de *drug delivery* com metodologia de fácil acesso e produção (GASCO, 1993; GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2018; MÜLLER; SHEGOKAR; KECK, 2011).

As SLNs representam a primeira geração de nanocarreadores, sendo partículas coloidais preparadas com lipídios sólidos em temperatura ambiente ou corporal, além de surfactantes, ingrediente ativo de interesse e água. Com tamanhos submicrônicos (menos de 1000 nm) (DOKTOROVOVÁ, S.; KOVAČEVIĆ, A. B.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B., 2016) e apresentam algumas vantagens como, possibilitar o uso de lipídios biocompatíveis, menor uso de solventes orgânicos durante a formulação, alta estabilidade *in vivo* e amplo espectro de aplicação. No entanto, existem algumas limitações nesse sistema, como baixa capacidade de encapsulamento de drogas, tendência imprevisível de gelificação, transições polimórficas e vazamento de drogas durante o armazenamento (CHAUHAN, ITI; YASIR, MOHD; VERMA, MADHU; SINGH, ALOK PRATAP, 2020).

Os NLCs são nanopartículas de lipídeos de segunda geração, desenvolvidas em 1999, criadas para superar as deficiências daquelas de primeira geração. O tamanho médio destas partículas varia entre 40 a 1000 nm, dependendo da combinação de lipídeos e surfactantes na composição da matriz lipídica. Os NLCs são formados a partir da mistura de lipídios biodegradáveis e compatíveis sólidos (triglicerídeos, alguns glicerídeos, ácidos graxos, esteroides e ceras) e líquidos, surfactantes e água (DOKTOROVOVA; SHEGOKAR; SOUTO, 2017; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

A principal vantagem da NLC consiste na presença de lipídeos líquidos na sua composição, evitando a recristalização do lipídeo sólido, contribuindo para uma estrutura menos ordenada evitando o vazamento do fármaco e aumentando a capacidade de aprisionamento da droga, minimizando a expulsão do fármaco após longos períodos de

armazenamento. Além disso, a solubilidade do medicamento na matriz lipídica, favorece uma liberação mais controlada em relação às SLNs. Dessa maneira, é obtido um sistema termodinamicamente mais estável, melhorando o sistema de entrega de medicamentos (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2018; GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E., 2018).

Os NLCs podem ser utilizados para a veiculação de medicamentos hidrofílicos e lipofílicos. E, por essa versatilidade, surgiu como um sistema inovador e promissor para entrega de produtos farmacêuticos em via oral, parenteral, ocular, pulmonar, tópica e transdérmica (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018), sendo atrativas às indústrias farmacêuticas devido ao uso de excipientes biocompatíveis que apresentam estabilidade coloidal e com baixo custo de desenvolvimento (CHAUHAN, ITI; YASIR, MOHD; VERMA, MADHU; SINGH, ALOK PRATAP, 2020; LÓPEZ-GARCÍA; GANEM-RONDERO, 2015). Por meio da otimização do NLC, é possível a produção de formulações com características melhores, com melhor solubilidade em meio biológico, meia vida longa, biocompatibilidade, proteção física das moléculas encapsuladas, capacidade de atingir a região-alvo e internalização celular (SALVI; PAWAR, 2019).

Vários lipídeos podem ser utilizados nas formulações de NLC e o principal critério de seleção é a miscibilidade fármaco-lipídeo (BUMMER, 2004). Alguns estudos já relataram melhor solubilidade de fármacos altamente lipofílicos, em triglicerídeos de cadeia média em relação aos triglicerídeos de cadeia longa. Com relação aos lipídeos líquidos, o ácido oleico é o ácido graxo mais utilizado, mas também podem ser empregados monoglicerídeos e diglicerídeos de ácidos graxos, obtidos naturalmente a partir de sementes de plantas ou sintetizados (KAUKONEN; BOYD; PORTER; CHARMAN, 2004).

A seleção de surfactantes apropriados também é essencial para o desenvolvimento da formulação. Os surfactantes são agentes tensoativos que por apresentar natureza anfifílica, apresenta a capacidade de reduzir a tensão na interface óleo e água. Além disso, conferem estabilidade na dispersão final e durante o armazenamento. Os critérios de seleção dos surfactantes incluem: a via de administração da nanopartícula, valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo do surfactante, modificação da superfície da nanopartícula e capacidade de prevenir a degradação *in vivo* do lipídeo (ATTAMA, MOMOH, BUILDERS 2012). Os surfactantes não-iônicos são os mais utilizados, incluindo o

Poloxamer 188 (Pluronic®-F68) (GORDILLO-GALEANO, ALDEMAR; MORA-HUERTAS, CLAUDIA ELIZABETH, 2018).

1.3 NLC como *drug delivery* na pele

A administração de medicamentos via oral é o método mais convencional utilizado para o tratamento das doenças. No entanto, o uso de drogas orais pode apresentar algumas limitações como degradação do fármaco no trato gastrointestinal, metabolismo sistêmico e vários efeitos colaterais. Por isso, a administração de fármacos pela pele apresenta vantagens óbvias no tratamento de doenças de perfil dermatológico. O direcionamento do fármaco é favorável não somente em relação a segurança, a epiderme é rica em APCs que favorecem uma melhor resposta imunológica (CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K., 2019).

A administração de medicamentos na pele pode ser via tópica, dérmica ou transdérmica. Enquanto todos são aplicados sobre a pele, apenas as formulações transdérmicas são capazes de alcançar a circulação sistêmica. A administração tópica de medicamentos representa a ação do medicamento em as camadas superficiais (por exemplo, epiderme), enquanto a droga dérmica entrega acontece quando o medicamento atinge a derme da pele. Os folículos capilares também podem ser uma via de penetração, tanto para administração dérmica e transdérmica de medicamentos, com aplicação especial para nanopartículas lipídicas, uma vez que NLCs são formados por lipídios, que também aparecem na composição do sebo em folículos pilosos (LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015).

O regime terapêutico das doenças de pele envolve especialmente, a administração tópica de fármacos para efeito local, ou seja, a absorção sistêmica não é recomendada. Dessa maneira, ocorre a redução de efeitos colaterais sistêmicos, mas também evita flutuações nos níveis plasmáticos de medicamentos. Além disso, permite que a droga seja administrada de maneira mais eficiente no local afetado. No entanto, o maior desafio para administração tópica é a eficácia limitada, necessidade de aplicação frequente e, principalmente, atravessar a camada mais externa da pele: o estrato córneo, especialmente porque a maioria dos fármacos utilizados no tratamento de doenças de pele são de natureza hidrofóbica (LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015).

INTRODUÇÃO

Os fármacos de aplicação na pele podem atravessar por duas vias potenciais: a transepidérmica ou via transapendégeal. Na via transepidérmica a droga atravessa o estrato córneo por penetração intra ou intercelular. Na rota intracelular o fármaco atravessa dentro dos corneócitos e permite o transporte de substâncias hidrofílicas. Já na rota intercelular, os fármacos lipofílicos atravessam o estrato córneo em torno dos corneócitos, em regiões ricas em lipídeos. A via transapendégeal permite o transporte de substâncias através das glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos (CZAJKOWSKA-KOŚNIK, ANNA; SZEKALSKA, MARTA; WINNICKA, KATARZYNA, 2019).

Neste contexto, os NLCs estão sendo amplamente utilizadas para minimizar as deficiências apresentadas nas formulações de uso tópico disponíveis. Os NLCs são formadas de lipídios biologicamente ativos e biodegradáveis que mostram menor toxicidade e oferecem diversos atributos como adesividade, oclusão, hidratação da pele, lubrificação, suavidade, emoliência, aumento da penetração na pele, liberação sustentada do medicamento, reduzindo a frequência das aplicações (LOO; BASRI; ISMAIL; LAU *et al.*, 2013; LÓPEZ-GARCÍA; GANEM-RONDERO; APPLICATIONS, 2015).

Um dos aspectos mais importantes dos NLCs é a capacidade de retardar a degradação química dos ativos carregados seja por vias fotoquímicas, hidrolíticas ou oxidativas. Isso acontece porque a estabilidade química da molécula do fármaco carregado depende da matriz sólida NLCs, com a menor presença de lipídeos sólidos o fármaco se rearranja melhor dentro da matriz lipídica evitando trocas com a fase aquosa (GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2018; SOUTO; ALMEIDA; MÜLLER, 2007).

O mecanismo de liberação da droga de um NLC consiste na difusão e degradação de partículas lipídicas na pele. Após a aplicação tópica, o aumento de temperatura ou evaporação de água cutânea, provocam mudanças na estrutura lipídica e, em consequência, a liberação do medicamento. A liberação pode ser influenciada pelo tipo de lipídeo usado para formular o veículo, concentração de surfactante, solubilidade, concentração do ativo utilizado e o método de formulação do NLC. Portanto, a escolha cada um dos componentes, bem como a estrutura e a estabilidade dos lipídios utilizados devem ser estudadas para o melhor preparo das formulações (CZAJKOWSKA-KOŚNIK, ANNA; SZEKALSKA, MARTA; WINNICKA, KATARZYNA, 2019).

Outro aspecto dos NLCs é o tamanho. O tamanho menor dos NLCs favorece um contato próximo com a SC, melhorando a penetração do composto ativo na pele. O tamanho dos nanocarreadores também diminui a perda da água da pele, retardam a perda de umidade e leva ao afrouxamento do empacotamento dos corneócitos e, com expansão do espaço intercorneócitos, há uma maior penetração do medicamento na pele (CHAUHAN, ITI; YASIR, MOHD; VERMA, MADHU; SINGH, ALOK PRATAP, 2020). E, interessante, estudos publicados mostram que a NLC consegue controlar a taxa de penetração do medicamento, limitando a absorção somente na pele e para que não ocorra absorção indesejada através da circulação sanguínea (PUGLIA; BONINA, 2012).

Além do tamanho, a penetração dos NLCs depende de sua composição e de suas propriedades físico-químicas, como agregação, carga na superfície da partícula, hidrofobicidade, solubilidade das partículas na pele, propriedades solubilizantes das partículas em relação aos lipídios da pele e se as partículas possuem capacidade de formação de filme (GILABERTE; PRIETO-TORRES; PASTUSHENKO; JUARRANZ, 2016).

1.4 Hidrogel

O hidrogel é uma forma farmacêutica capaz de sustentar a liberação de fármacos em amplo crescimento de aplicação. Os géis são sistemas coloidais formados por cadeias poliméricas reticuladas de estrutura tridimensional, em que há grande quantidade de líquido disperso. Os hidrogéis são classificados como um tipo de gel biocompatível, onde a água é o meio dispersante, formado por uma rede polimérica hidrofílica que permite a absorção ou retenção de água (PALMESE; THAPA; SULLIVAN; KIICK, 2019; SATARKAR; BISWAL; HILT, 2010).

Os hidrogéis possuem propriedades essenciais que os tornam adequados para aplicações biomédicas. No entanto, hidrogéis sintéticos tradicionais apresentam uma heterogeneidade e defeitos da formação de rede que afetam suas propriedades mecânicas, alteram as taxas de difusão e atividade de moléculas ativas (JIA; KIICK, 2009). Por isso, os hidrogéis híbridos foram desenvolvidos para melhorar as formulações existentes e expandir suas aplicações em medicamentos (CHIVERS; SMITH, 2017; WANG; ZHANG; BENOIT, 2018).

INTRODUÇÃO

Os hidrogéis híbridos são compostos por blocos quimicamente, funcionalmente e morfologicamente distintos, que podem incluir proteínas, peptídeos ou nano/microestruturas biologicamente ativas, interconectados por meios físicos ou químicos (LAU; KIICK, 2015). Além disso, os hidrogéis híbridos podem ainda melhorar a adesão celular, a organização e interações célula-célula contribuindo para integridade mecânica do tecido (MAISANI; PEZZOLI; CHASSANDE; MANTOVANI, 2017; SHIN; JUNG; ZALABANY; KIM *et al.*, 2013).

De modo geral, os hidrogéis apresentam aspecto rígido devido às cadeias interligadas apresentando resistência a dissolução em água. A flexibilidade dos movimentos das cadeias lhe confere certa elasticidade, assemelhando às propriedades mecânicas da matriz extracelular. Além disso, sua estrutura porosa pode ser facilmente modulada pela densidade de reticulação, favorecendo o carregamento de substâncias na matriz do gel, facilitando a entrega de fármacos e sua liberação dependente da difusão por um período prolongado (SATARKAR; BISWAL; HILT, 2010).

As nanopartículas podem ser incorporadas na rede de hidrogel por mistura com solução de monômeros, seguido por gelificação (hidrogel nanocompósito) (GAO; VECCHIO; LI; ZHU *et al.*, 2014). Alternativamente, também podem ser incorporadas na matriz do hidrogel após a formação do gel, a rede do gel se intumescce e incorpora as nanopartículas por aprisionamento. Essa metodologia é particularmente interessante quando as nanopartículas interferem no processo de gelificação (THOMAS; YALLAPU; SREEDHAR; BAJPAI, 2009).

Outra abordagem para montagem de um hidrogel coloidal de nanopartículas é o uso direto de nanopartículas como reticuladores para construir a rede de hidrogel 3D. Nesse caso, as nanopartículas são ligadas entre si por meio de interações hidrofóbicas ou pela mistura de nanopartículas com cargas de superfície opostas. Alternativamente, as nanopartículas podem fazer ligações covalentes que agem como nós para a formação da rede do hidrogel (GAO; VECCHIO; LI; ZHU *et al.*, 2014; GAO; ZHANG; ZHANG; ZHANG, 2016).

Para o desenvolvimento de hidrogéis, considera-se também o uso de biopolímeros naturais e sintéticos. A goma xantana é um polissacarídeo de cadeia ramificada de alta massa molecular, solúvel em água e biodegradável, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* (KUMAR; RAO; KWON; LEE *et al.*, 2017). Estudos recentes sobre

biomateriais baseados em xantana têm mostrado grande potencial para aplicação na engenharia de tecidos e processos de cicatrização (BOMBALDI DE SOUZA; BOMBALDI DE SOUZA; THORPE; MANTOVANI *et al.*, 2020; ELIZALDE-PEÑA; ZARATE-TRIVIÑO; NUÑO-DONLUCAS; MEDINA-TORRES *et al.*, 2013; FERREIRA; SARI; AZAMBUJA; DA SILVEIRA *et al.*, 2020; KUMAR; RAO; KWON; LEE *et al.*, 2017).

O colágeno é isolado de forma fácil e barata de tecidos como pele, tendão, pericárdio e outros e é amplamente utilizado como biomaterial (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010). A maioria dos hidrogéis a base de colégeno é preparada com colágeno tipo I, que compreende 90% da proteína do tecido conjuntivo humano. O colágeno tipo I é uma proteína de tripla hélice formada por cadeias polipeptídicas periódicas de 67 nm, com peso molecular de aproximadamente 300 kDa. Em presença de um solvente a base de água, as fibrilas de colágeno se montam de maneira autônoma em pH neutro, que se reticulam e formam a estrutura da matriz do hidrogel (ANTOINE; VLACHOS; RYLANDER, 2014). Estudos mostram que a concentração de colágeno *in vitro* e *in vivo* influencia as propriedades mecânicas do tecido, regulando assim o comportamento celular (CAREY; KRANING-RUSH; WILLIAMS; REINHART-KING, 2012; MIRON-MENDOZA; SEEMANN; GRINNELL, 2010).

1.5 Vitamina E

A vitamina E foi descoberta pela primeira vez em 1922 em vegetais de folhas verdes. Após 14 anos, foi bioquimicamente caracterizada e denominada de tocoferol, do grego: “tocos”, prole e “phero”, gerar, sendo considerada um nutriente importante para a reprodução humana (EVANS; BISHOP, 1922; FERNHOLZ, 1938). Considerada uma vitamina lipossolúvel, se apresenta em dois grupos principais: tocoferóis e tocotrienóis. Dentro de cada grupo existem quatro isômeros diferentes, ou seja, alfa, beta gama ou delta, de acordo com a presença e da posição do grupo metil na cadeia lateral (SEN; KHANNA; ROY, 2006).

A vitamina E, em especial o α -tocoferol, pode ser obtida através do consumo de diversos alimentos como óleos vegetais, óleo de palma, farelo de arroz, gérmen de trigo, azeitona, cevada, soja, nozes e grãos (AGGARWAL; SUNDARAM; PRASAD; KANNAPPAN, 2010). Os tocoferóis, e também os tocotrienóis são conhecidos por suas

potentes propriedades antioxidantes, com capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres. Isso acontece por dois motivos. O primeiro deles é que o tocoferol apresenta um grupo hidroxila no anel cromanol, que prontamente é capaz de doar o átomo de hidrogênio para estabilizar os radicais livres (PEH; TAN; LIAO; WONG, 2016).

O outro motivo está relacionado ao potencial do tocoferol é em retardar o processo de degradação do colágeno. A exposição da pele aos raios ultravioleta esgota os antioxidantes presentes nesse tecido com o passar do tempo (CHEN; HU; WANG, 2012). Por esse motivo, estudos demonstram que há uma maior concentração de tocoferol nas camadas mais profundas da pele. Dessa maneira, para proteger o estresse oxidante, o tocoferol pode ser suplementado topicamente para repor esses oxidantes presentes no estrato córneo (MAHAMONGKOL; BELLANTONE; STAGNI; PLAKOGIANNIS, 2005; THIELE; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, 2007; THIELE; TRABER; PACKER, 1998).

O papel do estresse oxidativo tem sido estudado nas doenças de pele. Em grandes quantidades, causam danos aos queratinócitos por meio da peroxidação lipídicas. Alguns dados sugerem também que o estresse oxidativo contribuem para a inflamação tecidual através da regulação positiva de fator nuclear kappa B (NF-kB), fator de transcrição importante para a produção de citocinas pró-inflamatórias (JI; LI, 2016; KRUK; DUCHNIK, 2014; WULLAERT; BONNET; PASPARAKIS, 2011).

Além disso, alguns estudos apontam que a vitamina E também possui efeitos anti-inflamatórios, o que vem despertando grande interesse entre os pesquisadores para investigar seu potencial terapêutico no tratamento de diversas doenças inflamatórias (GUPTA; PRASAD; AGGARWAL, 2016). Sob este aspecto, estudos demonstram que a vitamina E pode reduzir a produção e secreção de moléculas mediadoras de inflamação como os eicosanoides e a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) além de suprimir também vias pró-inflamatórias mediadas pelo NF-kB e pelo transdutor e ativador da transcrição 3 (STAT-3)(JIANG, 2014; KANCHI; SHANMUGAM; RANE; SETHI *et al.*, 2017; ZINGG, 2019).

Considerando que ainda não há cura para DA e o tratamento geralmente inclui o uso de corticosteroides, inibidores de calcineurina ou anti-histamínicos (ALEXANDER; MAXIM; CARDWELL; CHAWLA *et al.*, 2018), que embora apresente eficácia

comprovada, esses medicamentos podem apresentar efeitos adversos, especialmente quando utilizados a longo prazo. Neste caso, os antioxidantes fenólicos naturais como a vitamina E, podem apresentar um papel importante no controle da DA, sugerindo um potencial uso terapêutico (JAFFARY; FAGHIHI; MOKHTARIAN; HOSSEINI, 2015; JAVANBAKHT; KESHAVARZ; MIRSHAFIEY; DJALALI *et al.*, 2010; KATO; TAKAHASHI, 2012; TSOURELI-NIKITA; HERCOGOVA; LOTTI; MENCHINI, 2002).

Um estudo demonstrou que queratinócitos tratados com 20 e 40 μM de α -tocoferol por 18 dias tiveram redução da perda transepidérmica de água (PARISH; READ; PATERSON, 2005). Além disso, outros estudos realizados em queratinócitos sugerem que o tratamento com vitamina E estimula a expressão de transglutaminase-1, citoqueratina-10, involucrina, loricrina e aumento da concentração de ceramidas. De modo importante, a transglutaminase-1 desempenha papel importante na diferenciação dos queratinócitos, sendo essencial para a formação do estrato córneo (DE PASCALE; BASSI; PATRONE; VILLACORTA *et al.*, 2006; KATO; TAKAHASHI, 2012).

Considerando as evidências científicas, a vitamina E pode ser uma aposta para o tratamento da DA, por induzir anredução do estresse oxidativo, efeitos anti-inflamatórios, redução da perda de água transdérmica, regulação positiva da expressão gênica de marcadores de diferenciação de queratinócitos e proteínas de barreira epitelial. No entanto, embora a vitamina E apresente dados promissores para aplicação terapêutica futura, a sua aplicação pode ser prejudicada devido à baixa disponibilidade oral (MOHD ZAFFARIN; NG; NG; HASSAN *et al.*, 2020).

A Food and Drug Administration (FDA) define biodisponibilidade como a taxa ou a velocidade na qual um medicamento ou composto farmacêutico ativo é absorvido e torna-se disponível no local de ação. Na vitamina E, fatores como solubilidade, absorção, distribuição e taxa de eliminação podem estar diretamente relacionados à essas limitações farmacocinéticas (MOHD ZAFFARIN; NG; NG; HASSAN *et al.*, 2020). Por isso, estratégias de nanoformulações têm sido utilizadas para resolver o problema para potenciais aplicações terapêuticas (SAEZ; SOUZA; MANSUR, 2018).

1.6 Valerato de betametasona

Os glicocorticóides são uma subclasse de corticosteróides, que podem vir de duas fontes distintas: natural ou sintética. Os glicocorticóides naturais são produzidos pela glândula adrenal e são liberados para proteger o corpo contra a inflamação, estresse e choque. Os glicocorticóides sintéticos, de origem industrial, apresentam ação anti-inflamatória e imunossupressora, com isso, amplamente recomendado tratamento de várias doenças (KHATER; NSAIRAT; ODEH; SALEH *et al.*, 2021).

O Valerato de Betametasona (VB) é um glicocorticoide sintético de moderada intensidade (categoria 3), considerado um padrão ouro e referência em estudos clínicos com novos glicocorticoides, sendo amplamente utilizado no tratamento de doenças de pele inflamatórias (SHETTY; SHERJE, 2021; SIVARAMAKRISHNAN; NAKAMURA; MEHNERT; KORTING *et al.*, 2004). O tratamento com o creme de VB reduz a inflamação, liquenificação, ressecamento formação de crostas e descamação da pele e o prurido em indivíduos com DA (WOLF-JÜRGENSEN, 1979).

Apresenta meia-vida de 36 a 54 horas, o que permite que uma dose menor seja empregada para tratamento, em torno de 0,12% (CARLOS; URIBE; FERNÁNDEZ-PEÑAS, 2013; SHETTY; SHERJE, 2021). O mecanismo de ação do fármaco envolve a ligação a um receptor intracelular específico que resulta na modulação da transcrição de múltiplos genes, gerando a supressão da produção de mediadores inflamatórios como leucotrienos e prostaglandinas e a inibição do recrutamento de células inflamatórias para a pele (CARLOS; URIBE; FERNÁNDEZ-PEÑAS, 2013).

Atualmente, as formulações comercialmente disponíveis de VB são pomada, loção, gel, creme, spray e aerossol (SHARMA; THARMATT; SALOORIA; SHARMA *et al.*). Entretanto, nos últimos anos, os pesquisadores têm desenvolvido diferentes sistemas de nanocarreadores baseados em lipídeos para veiculação do VB: lipossomos, SLNs, NLCs, niossomos, nanoemulsões, nanofolhas e nanopartículas poliméricas (SHETTY; SHERJE, 2021).

Um estudo realizado com o encapsulamento VB em lipossomas demonstrou que o fármaco foi capaz de atuar na redução da irritação, supressão de mastócitos e melhora da retenção de água na pele, além de apresentar efeitos anti-inflamatórios *in vivo* e uma retenção epitelial do fármaco 2,68 vezes maior em relação ao creme comercial (EROĞLU; AZIZOĞLU; ÖZYAZIÇI; NENNI *et al.*, 2016).

INTRODUÇÃO

Além disso, o desenvolvimento de SLN na aplicação tópica de VB, usando monoestearina e cera de abelha como a fase lipídica demonstrou a eficiência em fazer a entrega localizada da droga ativa na pele, destacando seu potencial para a aplicação no tratamento de doenças de pele e minimizando a absorção sistêmica da droga (ZHANG; SMITH, 2011).

Outro estudo com SLNs sugere que essa metodologia pode ser usada eficientemente para o tratamento da DA, uma vez que maior quantidade do fármaco permaneceu na pele durante a aplicação quando comparado com a pomada. Os resultados deste estudo enfatizam a aplicabilidade de SLNs para criar um reservatório de fármaco na pele, com a droga localizada distintamente no estrato córneo (JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011).

2. Justificativa

A Dermatite Atópica (DA) é uma doença crônica, pruriginosa e inflamatória da pele caracterizada por períodos de remissão marcados por recidivas inflamatórias agudas, com prurido, dor, distúrbios do sono e saúde mental, impactando negativamente na qualidade de vida do paciente. Atualmente não existe cura para a DA e o principal objetivo do tratamento é minimizar os sintomas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. O manejo da doença envolve métodos de hidratação da pele, eliminação de gatilhos e contato com alérgenos e terapia medicamentosa.

A nanotecnologia tem proporcionado excelentes resultados quanto a entrega de produtos farmacêuticos pela pele. Os NLCs vêm se destacando por representarem sistemas de *drug delivery* de fácil acesso e produção, além de serem vantajosos às indústrias farmacêuticas não somente pelo uso de excipientes biocompatíveis, mas por apresentarem alta estabilidade coloidal e baixo custo de produção. Apesar disso, até o momento, não foram realizados estudos com o foco no desenvolvimento de NLCs para veiculação de α -tocoferol e/ou VB para tratamento de DA em modelo experimental. Desta forma, é relevante mencionar que o desenvolvimento dessa formulação por meio de metodologias de referência, com avaliação de parâmetros clínicos, histopatológicos e imunológicos é premente e necessário para uma nova abordagem terapêutica para a DA.

Os hidrogéis vem sendo amplamente utilizados para a aplicação tópica de fármacos, especialmente devido à sua capacidade de sustentar a liberação de fármacos e à alta capacidade de absorção e retenção de água. A estrutura porosa do hidrogel também pode ser facilmente modulada pela densidade e material de reticulação, favorecendo o carregamento de substâncias na matriz do gel, facilitando a entrega de fármacos e sua liberação dependente da difusão por um período prolongado, reduzindo a frequência das aplicações do fármaco, o que traz uma vantagem terapêutica.

Estudos recentes sobre biomateriais baseados em xantana têm mostrado grande potencial para aplicação na engenharia de tecidos e processos de cicatrização. A concentração de colágeno *in vitro* e *in vivo* influencia as propriedades mecânicas do tecido, regulando também o comportamento celular, contribuindo na manutenção da integridade de barreira epitelial. Por isso, a utilização desses biomateriais sugere boa aplicabilidade para a reticulação do hidrogel contendo NLCs para aplicação tópica no tratamento da DA.

Conforme o exposto, diante das estratégias de tratamento para DA disponíveis atualmente, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de estratégias terapêuticas

JUSTIFICATIVA

alternativamente eficazes, com reduzido potencial colateral. Por esse motivo, o uso de compostos baseados em sistemas de nanocarreamento de fármacos para aplicação tópica, de boa estabilidade, capazes de estimular efeitos anti-inflamatórios, promover hidratação da pele e a integridade da barreira epitelial, visando reduzir a dose, o tempo e, consequentemente minimizar os efeitos colaterais do tratamento são substancialmente importantes na elaboração de estratégias mais eficazes no tratamento da DA.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia terapêutica do uso de nanocarreadores lipídicos associados ao valerato de betametasona e/ou α -tocoferol em modelo celular e suas formulações em hidrogel para uso tópico em modelo murino de dermatite atópica.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar formulações contendo valerato de betametasona e/ou α -tocoferol incorporados a nanocarreadores lipídicos;
- Caracterizar as formulações determinando o tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão das partículas, concentração das partículas, pH e eficiência de encapsulamento das formulações;
- Avaliar a estabilidade dos nanocarreadores em diferentes condições de temperatura e períodos;
- Realizar a análise morfológica das nanopartículas;
- Analisar a citotoxicidade das formulações e determinar o IC50;
- Incorporar as formulações em um hidrogel e analisar a viscosidade para uso tópico;
- Estabelecer um protocolo de tratamento com as formulações em hidrogéis, avaliando os sinais clínicos e histopatológicos da doença nos animais após tratamento;
- Avaliar o perfil de anticorpos IgE e citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17 após o tratamento.

4. Material e Métodos

4.1 Preparo e caracterização das NLCs

4.1.1 Preparo das NLCs

As formulações de NLCs foram preparadas por ultrassonicação (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017). A fase oleosa foi composta pelos lipídios migliol 812 (líquido) (Dhymers Química Fina, Brasil) e miristato de miristila (sólido) (Dhymers Química Fina, Brasil), associada ao fármaco valerato de betametasona (VB) (Farma, Uberlândia, Brasil) (0,12% p/p) e/ou α -tocoferol (0,5%, líquido) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA). A fase aquosa foi constituída pelo surfactante Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e água.

A fase oleosa foi aquecida a 10 °C acima do ponto de fusão do lipídeo sólido em banho maria (RIBEIRO; BREITKREITZ; GUILHERME; DA SILVA *et al.*, 2017) e após solubilização, foi adicionada a fase aquosa à mesma temperatura e homogenizadas sob agitação a 1200 rpm por 2 minutos em um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA Werke, Staufen, Alemanha). A mistura foi sonicada por 15 min em sonicador Vibracell (Sonics & Mat. Inc., Danbury, CT, EUA), com 50 mA de potência, em ciclos alternados de 30 s (liga/desliga). Em seguida, a formulação foi imediatamente resfriada à temperatura ambiente em um banho de gelo.

As formulações preparadas (Tabela 1) foram mantidas à temperatura ambiente e abrigo de luz. O controle constituiu de NLCs na ausência do fármaco (NLC_{controle}).

Tabela 1. Composição e proporção dos compostos utilizados no preparo das diferentes formulações.

	MM: MG	P188	VB	α -tocoferol
NLC _{controle}	3:1	4%	-	-
NLC _{VB}	3:1	4%	0,12%	-
NLC α	3:1	4%	-	0,5%
NLC _{VBα}	3:1	4%	0,12%	0,5%

MM, miristato de miristila; MG, migliol; P188, polaxamer 188; VB, valerato de betametasona.

4.1.2 Medidas de tamanho e dispersão de partículas

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*, ou DLS) – espalhamento de luz quase-elástico (QELS), também conhecida por técnica Espectroscópica de Correlação por Fótons (do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*, ou PCSS) é baseada na mensuração de luz espalhada decorrentes do movimento browniano e fornece o tamanho médio das partículas e a polidispersidade do sistema como medida da distribuição do tamanho das partículas (CHAUHAN, ITI; YASIR, MOHD; VERMA, MADHU; SINGH, ALOK PRATAP, 2020; ZOSCHKE; SCHILRREFF; ROMERO; BRANDNER *et al.*, 2015).

Essa técnica foi empregada para determinar a média dos tamanhos das partículas e a dispersão das formulações preparadas. Os diferentes sistemas foram diluídos 1:1000 (v/v), e os resultados expressos como uma média de três medidas, utilizando o ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcester-shire, UK) a 25 °C.

4.1.3 Medidas de carga superficial ou potencial zeta

O potencial Zeta (PZ) é uma medida com a finalidade de prever e controlar a estabilidade de suspensões, dispersões ou emulsões coloidais. Os valores do potencial zeta (mV) foram determinados por espalhamento de luz eletroforético (ELS), de acordo com o método de eletroforese de laser Doppler, utilizando o ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcester-shire, UK) a 25 °C. Os diferentes sistemas foram diluídos 1:100 (v/v), e os resultados foram expressos como uma média de três medidas.

4.1.4 Medidas de tamanho e concentração de partículas

A análise de rastreamento das nanopartículas (do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) é uma técnica que se baseia na dispersão de luz, e analisa individualmente o movimento browniano de cada nanopartícula presente na dispersão (em tempo real usando câmara CCD, do inglês *charge-coupled device*). Foi utilizado o equipamento NanoSight NS300 (NanoSight, Reino Unido) com software NTA 3.1 Analytical, para caracterizar o tamanho e a concentração das nanopartículas.

As medidas foram realizadas após diluição das amostras em água deionizada (1:50.000, v/v). Em seguida, as amostras foram introduzidas no interior da porta amostra por meio de uma seringa esterilizada, até seu total preenchimento (~ 0,5 mL), utilizou-se um feixe de laser de diodo ($\lambda = 532$ nm). Cada vídeo foi obtido durante 60 segundos à temperatura ambiente (~25 °C). As medidas de tamanho foram realizadas em triplicata, com os dados expressos como a média \pm desvio padrão.

4.1.5 Medidas do Potencial Hidrogeniônico (pH)

A avaliação do pH das formulações foi realizada pela determinação potenciométrica, a partir da diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo, utilizando potenciômetro (DM22 Digimed, Brasil) previamente calibrado com os padrões de pH 7,0 e 4,0.

4.1.6 Ensaio de eficiência de Encapsulação (EE%)

O percentual de VB encapsulado na NLC foi determinado pelo método de ultrafiltração-centrifugação (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Alíquotas de 0,4 mL de amostra foram transferidas para uma unidade de filtração com poros de 10 kDa (Milex, Millipore), acopladas a tubos *ependorf* e centrifugadas por 10 min a 4100 x g. A solução filtrada foi coletada e o VB livre foi quantificado por CLAE, de acordo com os métodos validados. A eficiência de encapsulação (EE%) do fármaco foi calculada, conforme a equação:

$$EE\% = \frac{VB_{total} - VB_{livre}}{VB_{total}} \times 100$$

onde, VB_{total} é o total de VB quantificado na suspensão de NLC; VB_{livre} ou não encapsulado corresponde aos valores obtidos de VB no filtrado, através do método de ultrafiltração-centrifugação.

4.1.7 Estabilidade coloidal

O estudo de estabilidade das formulações foi realizado durante o período de estocagem de 12 meses, avaliando os parâmetros: diâmetro médio das partículas (nm), distribuição de tamanho, chamado de índice de polidispersão (PDI) e PZ. As formulações

foram armazenadas à 4°C, temperatura ambiente (~ 25 °C) e 40 °C, segundo os critérios para a realização dos estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos estabelecidos na RDC N°318/2019 (ANVISA).

4.1.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As análises de TEM foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss – LEO 906 (Zeiss- OberKochen, Alemanha) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp. Para o preparo da amostra, aproximadamente 10 µL da formulação contendo os NLC foram adicionados a um grid de cobre (Eletron Microscopy Sciences, EUA) com 200 Mesh.

Após 1 minuto, o excesso da amostra foi retirado com papel de filtro e, em seguida, uma gota de solução aquosa de uranila a 2% (p/p) foi adicionado sobre ela, na ausência de luz, no intuito de melhorar o contraste das imagens. O líquido em excesso novamente foi retirado e, na sequência, 10 µL de água deionizada foi adicionada, seguindo-se o mesmo procedimento para a retirada do excesso, após 2 minutos. Em seguida, o grid preparado foi mantido em repouso à temperatura ambiente (~25 °C) por 24h para a secagem das amostras e posterior análise no microscópio.

4.2 Ensaios *in vitro*

4.2.1 Cultivo celular de queratinócitos

A linhagem de queratinócitos humanos imortalizados, células HaCat, foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ (código BCRJ: 0341) e cultivados em frascos de cultura de 75 cm² contendo meio Dulbecco's Eagles modificado (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher) inativado a 56°C, 1% de antibiótico (10.000 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina), L-glutamina e aminoácidos essenciais em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂.

O repique celular foi realizado quando a monocamada celular atingiu o estágio de 85% confluência, com a tripsinização das células pela adição de 3 mL de solução contendo 0,25% de Tripsina e 0,2% de EDTA, preparadas em solução de NaCl 0,9%. Após o descolamento das células o processo foi interrompido pela adição de DMEM

suplementado com 10% de SFB, pois a presença de alfa 1-anti-tripsina no soro neutraliza a ação da tripsina. Após a lavagem das células obtidas com DMEM, as mesmas foram transferidas para novos frascos de cultura de 75 cm², e mantidas para os experimentos posteriores (BOUKAMP; PETRUSSEVSKA; BREITKREUTZ; HORNUNG *et al.*, 1988).

4.2.2 Viabilidade celular e citotoxicidade

A viabilidade celular de queratinócitos após incubação com as formulações desenvolvidas foi avaliada por ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983). Os queratinócitos foram cultivados em placas de 96 poços (5 x 10⁵ células/poço/200 µL) em meio completo. Após 24 horas as células estavam completamente aderidas na placa foram adicionados os estímulos. Para avaliar o efeito citotóxico dos NLCs foram testados estímulos por 24 horas com concentrações crescentes das nanocarreadores (10⁷ - 10¹³ NLC/mL) diluídos em meio completo.

Para avaliar o efeito citotóxico em relação a concentração do VB livre (VB_{livre}) e na formulação encapsulada (NLC_{VB}), os testes foram realizados em diferentes molaridades (0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1 e 2,5 mM). A solubilização do VB livre foi realizada utilizando 2% de dimetilsulfóxido (DMSO). Sob estas condições, o estímulo com o VB livre foi realizado por 24 horas e o ensaio com NLC_{VB} foi realizado em 24 e 72 horas.

Para análise da citotoxicidade do α-tocoferol, as células HaCat foram incubadas com 12, 6, 3 ou 1,5 mM. de α-tocoferol na forma livre solubilizada em 4% de DMSO ou encapsulada (NLC_α). O ensaio foi realizado com estímulo por 24 e 72 horas de α-tocoferol livre ou 24 horas com NLC_α. A título de comparação e sob as mesmas condições, o ensaio de viabilidade celular também foi realizado com as formulações NLC_{controle} e NLC_{VBα}. Como controle, as células foram incubadas, nas mesmas condições, somente com meio completo.

Após estes diferentes intervalos de tempo, o sobrenadante foi removido. As placas foram lavadas com PBS 0,01M, pH 7,2 e os queratinócitos foram pulsados com 100 µL/poço de MTT (Sigma-Aldrich) a 0,5 mg/mL, 4 horas antes do término do período de incubação com os estímulos e mantidas em condições de cultura. Posteriormente, foi feito

o descarte do sobrenadante e adicionado solução de SDS 10% e N-dimetilformamida 50% (100 µL/poço) para a solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do anel tetrazólico do sal MTT.

A leitura foi realizada após 30 minutos a 570 nm em leitora de placas (BioTek Epoch, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação aos controles para cada uma das formulações testadas. Esses dados também foram utilizados para o cálculo da metade da concentração inibitória máxima (IC50) das formulações, utilizando o software *GraphPad Prism* 8.0.1.

4.3 Preparo das formulações em hidrogel

Para aplicação tópica nos testes *in vivo*, as formulações de hidrogel contendo as NLCs foram preparadas conforme De Moura e colaboradores. Na formulação, 1% (p/v) colágeno e 2% (p/v) de xantana foram incorporados diretamente nas NLCs e homogenizadas em um agitador magnético a 1200 rpm por 10 minutos à 40 °C. Após esse período, as formulações são submetidas a um agitador mecânico por mais 40 minutos até adquirirem uma textura homogênea e mais consistente. O hidrogel para uso tópico foi armazenado sob refrigeração entre 4-8 °C (DE MOURA; RIBEIRO; DE CARVALHO; RODRIGUES DA SILVA *et al.*, 2021a).

4.3.1 Análise reológica

As medidas de reometria oscilatória dos hidrogéis foram mensuradas utilizando o viscosímetro Brookfield TC602 (Massachusetts, EUA) de placa cônica, a 25 °C (para simular a temperatura de aplicação na pele), com taxa de cisalhamento na faixa de 1-100 Hz e tensão de cisalhamento constante (1 Pa). A viscosidade dinâmica foi calculada usando o software Brookfield Rheo 3000 (Massachusetts, EUA).

4.4 Ensaios *in vivo*

4.4.1 Modelo murino de DA e tratamento

Os ensaios realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) sob o número 029/2018 (ANEXO 1). As lesões semelhantes a DA foram induzidas pela aplicação tópica de dinitroclorobenzeno (DNCB) em fêmeas de

MATERIAL E MÉTODOS

camundongos de linhagem BALB/c (5-6 semanas). A sensibilização dos animais foi feita com aplicação de 40 μ L de DNCB 0,5% em acetona/óleo de oliva (4:1) por três dias seguidos (dia 1- dia 3) na orelha (**Figura 1**). No dia 14, iniciaram-se os desafios com aplicação de 20 μ L de DNCB 0,5% em dias alternados pela manhã (14, 16, 18, 20, 22 e 24). O tratamento tópico com as diferentes formulações foi realizado após 6 horas de intervalo, no período da tarde, nos mesmos dias dos desafios. No dia 25, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta de sangue e tecido da orelha.

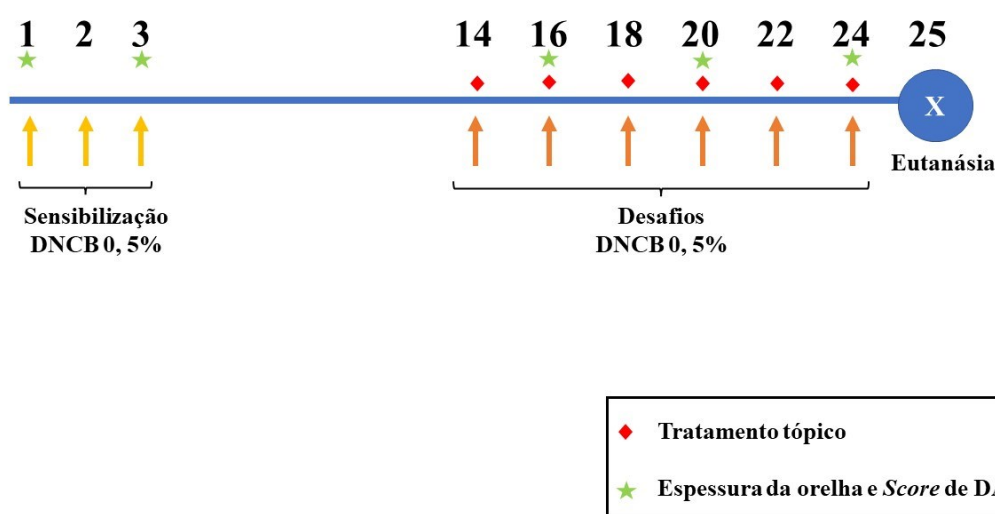


Figura 1. Protocolo experimental da DA por DNCB e tratamento com as formulações de uso tópico.

4.4.2 Sinais clínicos de DA

Os sinais clínicos da inflamação da pele foram analisados durante o ensaio indução e tratamento da DA nos dias 16, 20 e 24 em modelo murino (**Figura 1**). Foram avaliados eritema/hemorragia, edema, escoriação/erosão e descamação/secura, sendo atribuída uma pontuação de 0 a 3 (*score*) para cada um desses parâmetros de acordo com a gravidade: 0 (nenhum), 1 (leve < 20%), 2 (moderado 20-60%) e 3 (grave > 60%) (YU; WANG; WAN; ZHAI *et al.*, 2018). O edema foi mensurado utilizando um paquímetro eletrônico para avaliar a espessura da orelha dos animais. A pontuação para edema foi atribuída da seguinte maneira: 0 (nenhum < 0,23 mm), 1 (leve > 0,23 ≤ 0,26 mm), 2 (moderado > 0,26 ≤ 0,34 mm) e 3 (grave ≥ 0,35 mm).

4.4.3 Amostras biológicas

As amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital através de uma cânula heparinizada. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min para a obtenção do soro e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise.

Amostras de orelha foram retiradas por corte, pesadas e incubadas com inibidor de proteases (ComplEte, Roche) segundo a 300 mL/ 100 mg de tecido. Essas amostras foram trituradas em um homogeneizador rotativo e submetidas a centrifugação à 17000 x G à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo o sobrenadante (homogenato) armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para utilização futura.

4.4.4 Análise histopatológica

Os tecidos de orelha foram fixados em formaldeído 4% (v/v) em PBS, embebidos em parafina, cortados em secções de 3-5 μm e corados com hematoxilina e eosina (H&E) e azul de toluidina (AT) para análise do infiltrado inflamatório e recrutamento de mastócitos, respectivamente. As lâminas coradas em H&E e AT foram escaneadas no Leica Biosystems Scanner e as imagens foram capturadas e analisadas utilizando o software Aperio Image Scope 12.3, em aumento de 10x.

4.4.5 Quantificação de IgE total

Os níveis de IgE total no soro e homogenato de tecido de orelha foram quantificados por ELISA para detecção de IgE total de camundongo (Bethyl Laboratories, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, a placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de afinidade anti-IgE de camundongo purificado (1: 100) diluído em tampão de carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 por 1 hora a temperatura ambiente.

Após incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem (50 mM Tris, 0,14 M NaCl e 0,05% de Tween 20). As ligações inespecíficas foram bloqueadas utilizando a solução de bloqueio (50 mM Tris, 0,14 M NaCl e 1% de BSA, pH 8,0). As amostras foram diluídas 1:2 (soro) e 1:5 (homogenato) em solução de bloqueio e aplicadas em duplicata na placa. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo de detecção (1:75.000) diluído em solução de bloqueio.

A reação foi revelada pela adição de TMB (TetraMetilBenzidina – Thermo Fisher) e a absorbância das amostras foi lida em um espectrofotômetro (BioTek Epoch, Califórnia, EUA) a 450 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em valores de concentração através do software Microplate reader (Wuxi,China), usando como referência os valores de absorbância da curva-padrão, construída com a diluição de IgE em concentrações conhecidas. O limite de detecção do ensaio foi de 3,9 ng/mL.

4.4.6 Quantificação de citocinas

As citocinas murinas Th1/Th2/Th17 (IFN γ , TNF α , IL6, IL-17A, IL-10, IL-2 e IL-4) foram mensuradas no homogenato de tecido de orelha pelo método de captura, utilizando-se *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o homogenato e padrões de citocinas foram incubados com microesferas (beads) de captura de tamanho e fluorescência conhecidas, recobertas com anticorpos específicos que permitem a ligação das respectivas citocinas.

Os anticorpos de detecção conjugados com ficoeritrina (PE) foram adicionados subsequentemente e, após as incubações, foi acrescentado tampão de lavagem e centrifugado a 200 x g por 5 minutos. Os sedimentos contendo as beads foram ressuspensos em 300 μ L e submetidos à análise no citômetro de fluxo BD FACSSelesta™ (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados pelo Software FCAP Array (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA versão,1.0.1), observando os limites de detecção de cada citocina: IFN γ (0,5 pg/mL), TNF α (0,9 pg/mL), IL6 (1,4 pg/mL), IL-17A (0,8 pg/mL), IL-10 (16,8 pg/mL), IL-2 (0,1 pg/mL) e IL-4 (0,03 pg/mL).

4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados no software *GraphPad Prism* (versão 8.0.1). O teste de normalidade de Kolmogorov foi aplicado para a escolha do teste apropriado para análise estatística dos dados. A análise de estabilidade, tamanho, PZ, PDI dos nanocarreadores foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey's. Os dados de viabilidade celular foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis com pós teste de comparação múltipla de Dunn ou One-Way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças estatísticas entre os

MATERIAL E MÉTODOS

dados do fármaco livre e encapsulado, a produção de IgE e citocinas foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados

5.1 Tamanho, PDI, PZ, pH e %EE dos NLCs

O tamanho hidrodinâmico e a dispersão das partículas, avaliados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), mostraram que as formulações apresentaram tamanhos entre $190,8 \pm 1,5$ nm e $209,0 \pm 3,5$ nm (Tabela 2). Ao comparar as NLCs sem fármaco (NLC_{controle}) com aquelas que contendo o fármaco e/ou o α -tocoferol (NLC_{VB}, NLC α e NLC_{VB α}), foi evidenciado diferença nos tamanhos das partículas apenas para o NLC_{VB α} ($p < 0,05$). O PDI apresentou valores menores que 0,20.

O PZ das formulações apresentou valores negativos e de valor absoluto diferentes de zero, entre $-25,9 \pm 0,90$ mV e $-34,1 \pm 0,87$. As partículas apresentaram pH entre 6 e 7 e alta eficiência de encapsulação (%EE) do fármaco valerato de betametasona (>98%).

Tabela 2. Análise do tamanho hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (PZ) medidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), pH e eficiência de encapsulação (%EE) das formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC α e NLC_{VB α} , após 24h da síntese.

	Tamanho hidrodinâmico (nm)	PDI	PZ (mV)	pH	EE (%)
NLC _{controle}	$198,1 \pm 1,6$	$0,155 \pm 0,080$	$-25,9 \pm 0,90$	7,07	NA*
NLC _{VB}	$190,8 \pm 1,5$	$0,176 \pm 0,006$	$-34,1 \pm 0,87$	6,76	$98,3 \pm 0,1$
NLC α	$192,9 \pm 1,2$	$0,186 \pm 0,016$	$-29,9 \pm 1,42$	6,48	NA
NLC _{VBα}	$209,0 \pm 3,5$	$0,190 \pm 0,031$	$-32,8 \pm 0,62$	6,06	$98,0 \pm 0,3$

PDI, índice de polidispersão; PZ, potencial zeta; EE%, eficiência de encapsulamento.

*NA: Não se Aplica.

5.2 Concentração de partículas por NTA

A análise da concentração das partículas determinada pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (ou Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) mostrou que as formulações desenvolvidas apresentaram concentrações em valores na ordem de 10^{13} NLC/mL, com variação de 1,9 a $4,6 \times 10^{13}$ NLC/mL (Tabela 3).

As formulações apresentaram tamanho hidrodinâmico entre $147,0 \pm 1,4$ nm a $183,0 \pm 10,5$ nm, com diferença significativa entre NLC_{VB} e NLC_{VB α} em relação NLC_{controle} ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), enquanto NLC_{controle} e NLC α apresentaram tamanhos semelhantes.

RESULTADOS

Tabela 3. Análise do tamanho hidrodinâmico (nm) e concentração de partículas/mL, medidas por rastreamento de nanopartículas (ou Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) nas formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC_α e NLC_{VBα}, após 24h da síntese.

	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Concentração (10 ¹³ nanocarreadores/mL)
NLC _{controle}	162,0 ± 2,0	3,2 ± 0,4
NLC _{VB}	147,0 ± 1,4	4,6 ± 0,2
NLC _α	170,0 ± 5,5	1,9 ± 0,3
NLC _{VBα}	183,0 ± 10,5	3,8 ± 0,2

A partir da concentração de partículas, foi possível estimar a quantidade de moléculas que compõe uma partícula individual de NLC_{controle} e NLC_{VBα} (Ribeiro et al. 2016; Antonow et al. 2018). Para este cálculo foram considerados – a constante de Avogadro ($1M = 6,022 \times 10^{23}$ mol), o número médio de partículas medido por NTA (N_p), a massa do composto (m), o volume total de amostra (V), a massa molar do composto (MM) e a %EE de VB. Primeiramente, a concentração molar (M) de cada composto foi calculada, utilizando a Equação 1:

$$M = \frac{m (g)}{MM \times V (L)} \quad \text{Equação 1}$$

Por fim, com os dados de NTA (Tabela 3) obteve-se uma medida do número de partículas NLC/mL na suspensão. Com essas informações foi possível estimar quantas moléculas de cada componente estaria presente em cada nanopartícula utilizando a Equação 2:

$$\frac{molec}{NLC} = \frac{x}{N_p} \quad \text{Equação 2}$$

onde x = número de moléculas de cada componente e N_p = número de partículas, determinado por NTA.

Os dados da Tabela 4 mostram a estimativa da quantidade aproximada de moléculas de Miristato de Miristila (MM) Miglyol 812 (MG), Polaxamer 188 (P188), α -tocoferol e VB que compõe uma partícula de NLC.

RESULTADOS

Tabela 4. Resultados de NTA: número estimado de moléculas de excipiente por NLC calculado a partir de sua concentração molar na formulação.

	Compostos (excipientes e fármaco)				
	MM	MG	P188	α -tocoferol	VB
PM	424,7 g/mol	278,13 g/mol	8400 g/mol	431,71 g/mol	476,6 g/mol
[M]	0,18 mol/L	0,09 mol/L	0,005 mol/L	0,11 mol/L	0,025 mol/L
Composição ($\times 10^4$ moléculas/NLC)					
NLC _{controle}	340	169	9	-	-
NLC _{VB}	236	118	6	-	33
NLC _{α}	570	285	16	349	-
NLC _{VBα}	285	143	8	174	50

MM, miristato de miristila; MG, migliol, P188, poloxamer 188 e VB, valerato de betametasona.

Com esses cálculos foi possível inferir a contribuição de cada componente na estruturação de uma única NLC, o que permitiu propor uma representação da nanopartícula, considerando as razões molares de seus constituintes (Figura 2).

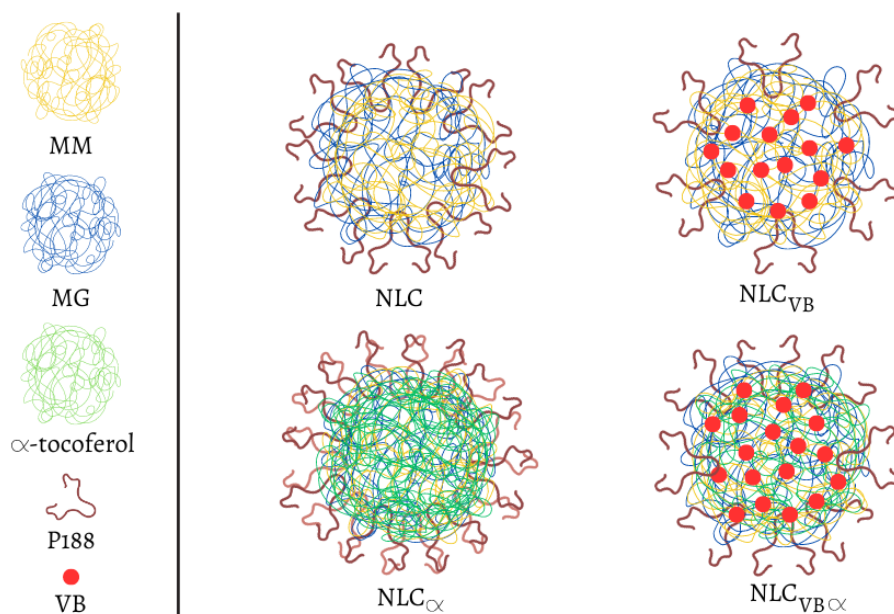


Figura 2. Representação esquemática das NLC com base na estimativa da quantidade aproximada de moléculas de Miristato de Miristila (MM), Miglyol 812 (MG), Poloxamer 188 (P188), α -tocoferol e valerato de betametasona (VB), calculada por meio dos dados obtidos por NTA (Tabela 4). Criado com *software* Canva (2023).

5.3 Estabilidade dos NLCs

Para a análise do tempo de estabilidade as formulações preparadas foram monitoradas ao longo de 12 meses através da avaliação do tamanho hidrodinâmico

RESULTADOS

(Figura 3A-D), PDI (Figura 3E-H) e PZ (Figura 3I-L) nas temperaturas de 4, 25 e 40 °C, pela técnica de DLS. As formulações NLC_{Controle}, NLC α e NLC_{VB} não apresentaram variações de tamanho significantes até 12 meses, nas temperaturas de 25 e 40 °C. Já a formulação NLC_{VB α} , não apresentou variação de tamanho estatisticamente significativo até o 8º mês e 10º mês de análise nas temperaturas de 25 °C e 4 °C, respectivamente. NLC_{controle} a partir do 2º mês já apresentou alterações significativas de tamanho, na temperatura de 4°C.

Não houve variação no PDI entre as diferentes formulações produzidas. O PZ apresentou variação significativa para a formulação NLC_{VB}, nas temperaturas de 4 e 40 °C, no 12º e 8º mês, respectivamente. Já a formulação NLC_{VB α} se manteve sem variações significativas de PZ até o 10º, 12º e 4º mês nas temperaturas de 25, 4 e 40 °C, respectivamente.

RESULTADOS

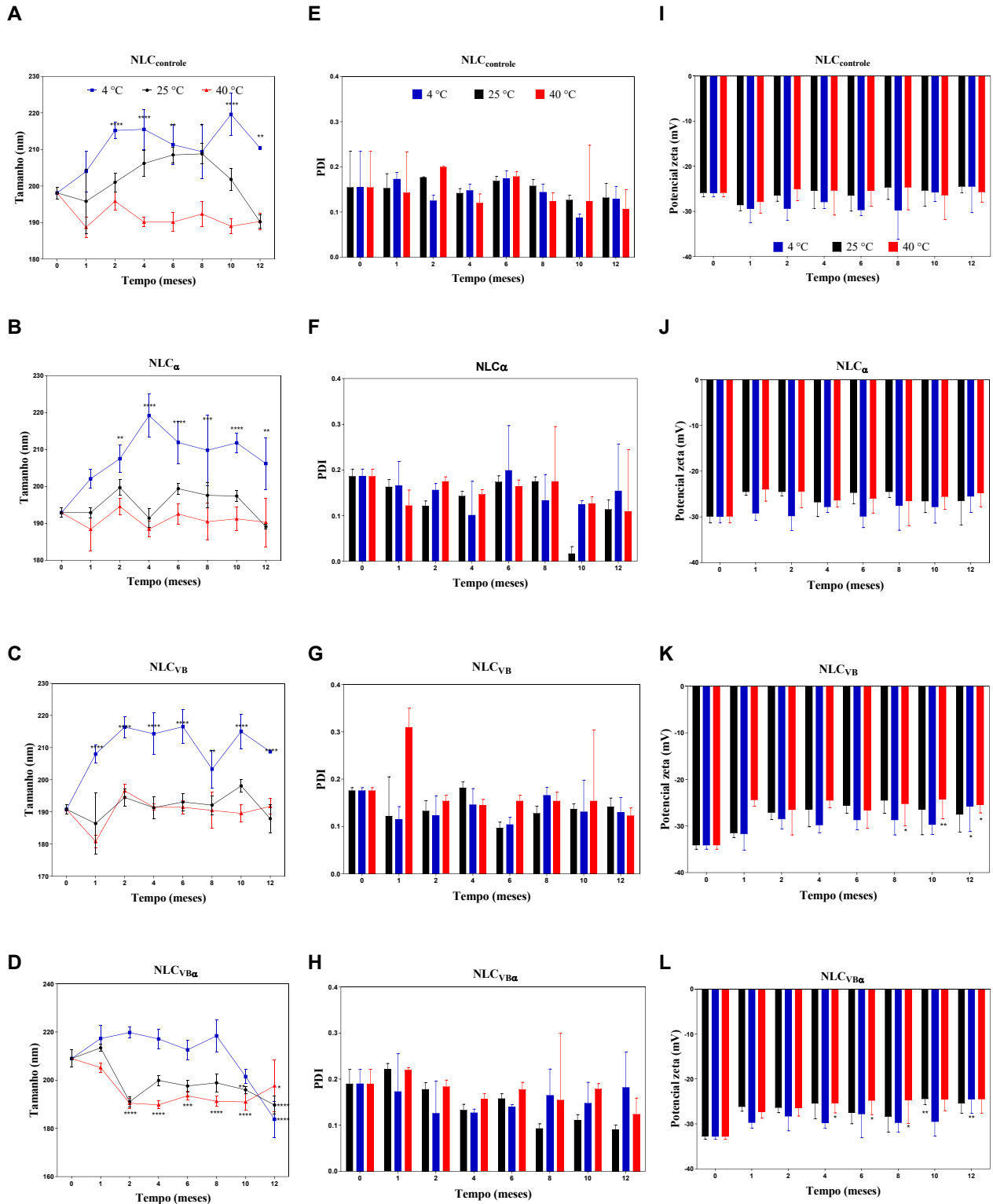


Figura 3. Estabilidade das formulações NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC_α e NLC_{VBα} ao longo de 12 meses. (A-D) Variação do tamanho médio, (E-H) variação do PDI e (I-L) variação do Potencial Zeta das partículas em função tempo. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As diferenças estatisticamente significantes do tempo 0 foram determinadas por *Two way* ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey com significância para **p* < 0,05; ** *p* < 0,01; ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001.

RESULTADOS

5.4 Morfologia de NLCs

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) permitiram obter informações sobre a morfologia e formato das nanopartículas lipídicas. Na Figura 4, estão demonstradas as formulações controle (A-B), com α -tocoferol (C-D) ou VB (E-F) e em *co-delivery* (G-H). Todas as partículas apresentaram aspecto predominantemente esférico e com superfícies suaves.

Cabe também ressaltar que a adição de VB ou α -tocoferol ao sistema não alterou a morfologia das nanopartículas (Figura 3C, E e G).

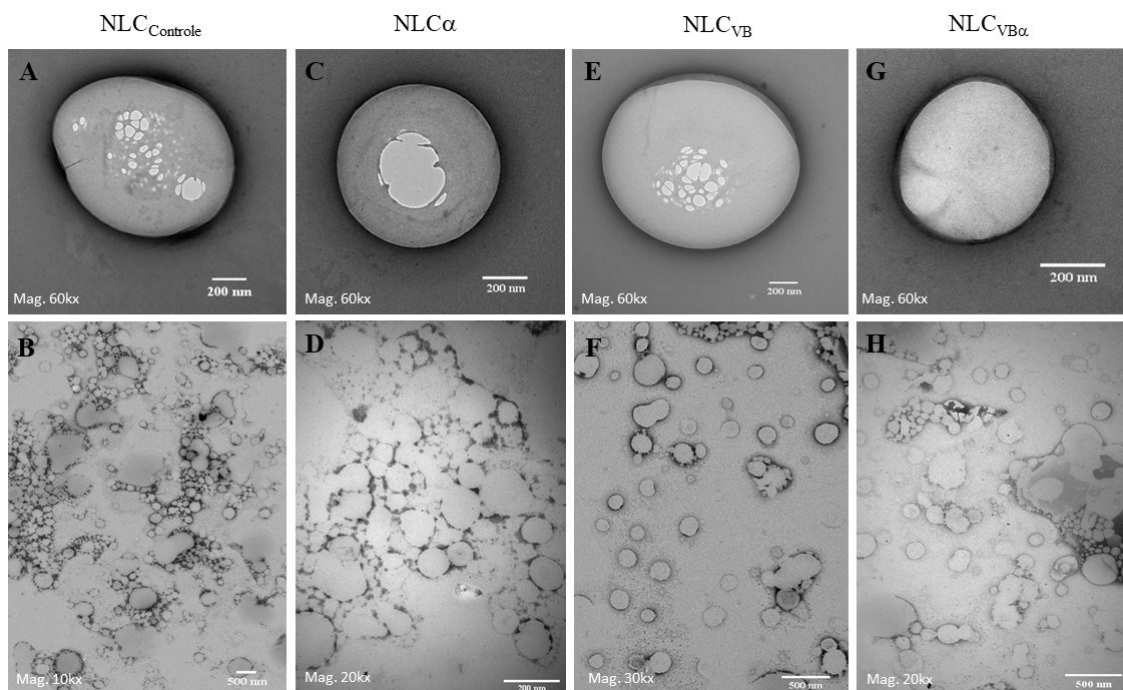


Figura 4. Micrografias eletrônicas de transmissão das nanopartículas lipídicas das formulações NLC_{controle} (A-B), NLC _{α} (C-D), NLC_{VB} (E-F) e NLC_{VB α} (G-H). Magnitudes: 60.000x (A, C, E, G) e 10.000x (B), 20.000x (D e H), 30.000x (F). Escala = 200 nm ou 500 nm.

5.5 Viabilidade celular e citotoxicidade dos NLCs

A análise de diferentes concentrações das nanoestruturas NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC _{α} e NLC_{VB α} sobre a viabilidade das células HaCat foi realizada pelo método de MTT. Alta porcentagem de células viáveis (> 67%) foram identificadas após 24 horas de estímulo com 10^7 a 10^{13} NLC/mL dos nanocarreadores preparados (Figura 5). Observou-se que o aumento da concentração das NLCs não reduziu significativamente da

RESULTADOS

viabilidade das células estimuladas com as formulações $NLC_{controle}$, NLC_{α} e $NLC_{VB\alpha}$ e apenas em alta concentração (10^{13} NLC/ mL) houve diminuição significativa ($p < 0,5$) do percentual de células viáveis (67%) estimuladas com NLC_{VB} .

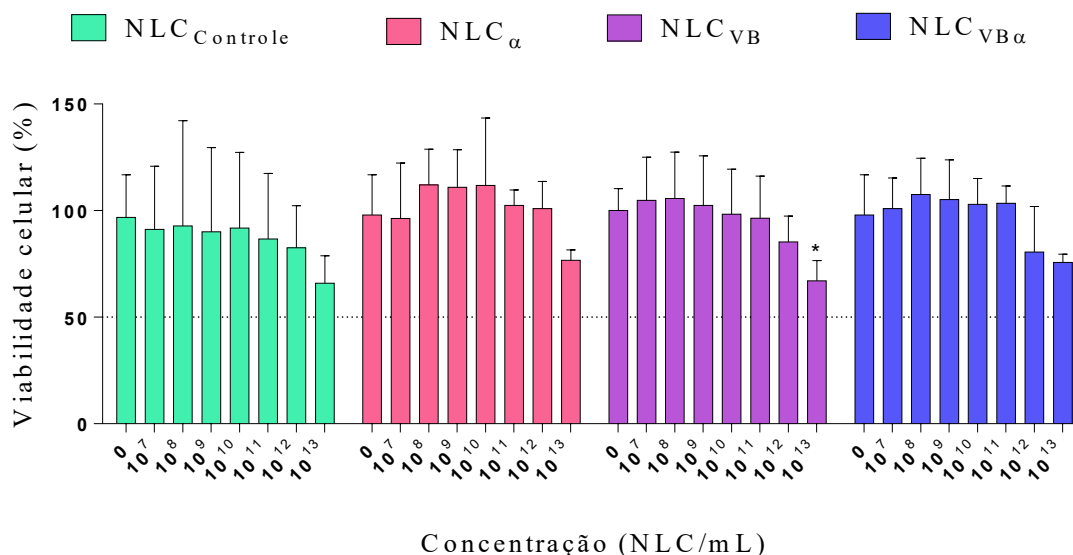


Figura 5. Análise da viabilidade de células HaCat após incubação com as formulações $NLC_{controle}$, NLC_{VB} , NLC_{α} e $NLC_{VB\alpha}$ em diferentes concentrações de partículas, por ensaio de MTT. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 horas de incubação com 10^7 - 10^{13} NLC/mL das formulações desenvolvidas. Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana \pm variância e média \pm desvio padrão apenas para o grupo NLC_{VB} . As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por Kruskal Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn ou *One-Way* ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey, com significância para * $p < 0,05$.

A partir dos dados de viabilidade celular, foi possível calcular a concentração necessária de partículas presentes nas formulações desenvolvidas para reduzir em 50% a porcentagem das células viáveis (IC50) (Tabela 5). Observamos que a formulação que apresentou menor citotoxicidade foi a NLC_{α} (IC50 = $4,789 \times 10^{12}$ NLC/mL), com maior efeito citotóxico sendo alcançado pelo $NLC_{VB\alpha}$ ($2,465 \times 10^{11}$ NLC/mL).

Tabela 5. Valores de IC50 determinados para as formulações $NLC_{controle}$, NLC_{VB} , NLC_{α} e $NLC_{VB\alpha}$, em células HaCat.

Formulações	IC50 (10^{11} NLC/mL)	R square
$NLC_{controle}$	19,65	0,7428
NLC_{VB}	21,63	0,7599
NLC_{α}	47,89	0,7133
$NLC_{VB\alpha}$	2,465	0,8149

5.6 Efeito do nanoencapsulamento sobre viabilidade celular/citotoxicidade

Para avaliar o efeito do nanoencapsulamento dos compostos sobre a viabilidade celular, o ensaio realizado utilizando diferentes molaridades de VB (0,12; 0,25; 0,5, 1 e 2,5 mM) e α -tocoferol (1,5; 3 e 6 mM) livre e nas mesmas condições com as respectivas formulações encapsuladas (Figura 6). A fim de investigar as diferenças relacionadas ao tempo de incubação com as formulações os ensaios foram conduzidos em 24 e 48 horas.

O estímulo por 24 horas com VB livre apresentou um potencial efeito citotóxico para as células HaCat, reduzindo significativamente ($p < 0,001$) a viabilidade dessas células (17%) mesmo em baixas concentrações (0,25 mM) (Figura 6A). Analisando o encapsulamento do fármaco, após 24 horas de estímulo a redução do percentual de células viáveis foi estatisticamente reduzida ($p < 0,001$) apenas na maior concentração de VB (2,5 mM). Observou-se que mesmo após 72 horas de incubação com a NLC_{VB}, o encapsulamento apresentou melhor desempenho que o fármaco livre, reduzindo significativamente ($p < 0,001$) a população de células viáveis (52%) a partir de 0,5 mM de VB.

Diferentemente, em relação ao α -tocoferol, as células apresentaram alta viabilidade (>100 %) após 24 ou 72 horas de estímulo (Figura 6B). Ao encapsular o α -tocoferol, a viabilidade celular (40%) foi reduzida significativamente ($p < 0,001$) após 24 horas de estímulo com 1,5 mM de NLC _{α} , atingindo 24% de células viáveis na maior concentração (6 mM).

Para efeito comparativo os ensaios também foram conduzidos sob as mesmas condições, com os volumes com as molaridades equivalentes a 1,5; 3 e 6 mM de α -tocoferol para a formulação vazia (NLC_{controle}) (Figura 6C) e a formulação em *co-delivery* (NLC_{VB α}) (Figura 6D) após 24 e 72 horas de estímulo. A avaliação do ensaio permite evidenciar que o estímulo com NLC_{controle}, apresentou redução gradual e significativa ($p < 0,001$) da viabilidade celular atingindo 26% e 27% de células viáveis, na maior concentração, após 24 e 72 horas de estímulo, respectivamente. Os resultados para NLC_{VB α} também demonstraram redução gradual e significativa ($p < 0,001$) da porcentagem de células viáveis, atingindo 44% e 24% de viabilidade celular em estímulo de 6 mM, após 24 e 72 horas, respectivamente.

RESULTADOS

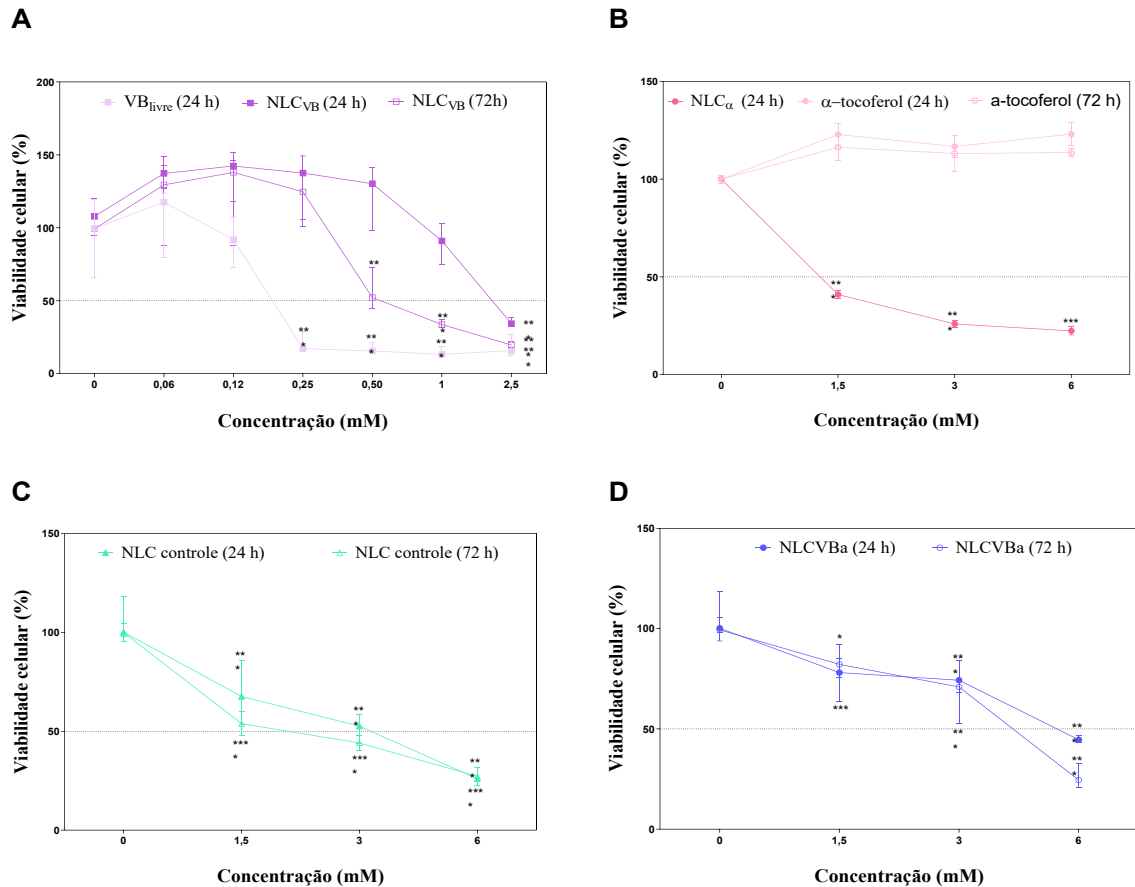


Figura 6. Análise da viabilidade celular por MTT após incubação com as formulações desenvolvidas, em diferentes molaridades de VB e α -tocoferol livres ou encapsulados. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 ou 72 horas de incubação com 0,06 a 2,5 mM de VB_{livre} ou NLC_{VB} (A); 1,5 a 6 mM α -tocoferol livre ou NLC _{α} (B) e 1,5 a 6 mM de NLC_{controle} (C) ou NLC_{VB α} (D). Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana \pm variância e média \pm desvio padrão apenas para o grupo NLC_{controle} 72 horas de estímulo. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas em comparação com o controle negativo, utilizando o teste de Mann Whitney ou Teste T não pareado com correção de Welch, com significância para * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Os dados de viabilidade celular foram utilizados para o cálculo da concentração de VB necessária para reduzir em 50% a porcentagem das células viáveis (IC₅₀) (Tabela 6). Observamos que a formulação NLC_{VB}, aumentou o IC₅₀ do VB, demonstrando que o encapsulamento pode reduzir a citotoxicidade do fármaco livre. As concentrações de α -tocoferol utilizadas como estímulo no ensaio de MTT, não permitiram a construção de uma curva decrescente de viabilidade celular, inviabilizando o cálculo do IC₅₀ para o α -tocoferol livre.

RESULTADOS

Tabela 6. - Valores de IC50 determinados para VB em solução (VB_{livre}) ou encapsulado (NLC_{VB}), em células HaCat.

Formulações	IC50 (mM)	R square
VB _{livre}	0,1494	0,9643
NLC _{VB}	0,4057	0,9320

5.7 Viscosidade dos hidrogéis

O hidrogel desenvolvido apresentou transparência, aspecto aquoso e textura homogênea. As formulações que incorporaram as NLCs apresentaram uma coloração esbranquiçada e aspecto homogêneo (dados não apresentados). A Figura 7 mostra a representação esquemática do hidrogel contendo as nanoformulações.

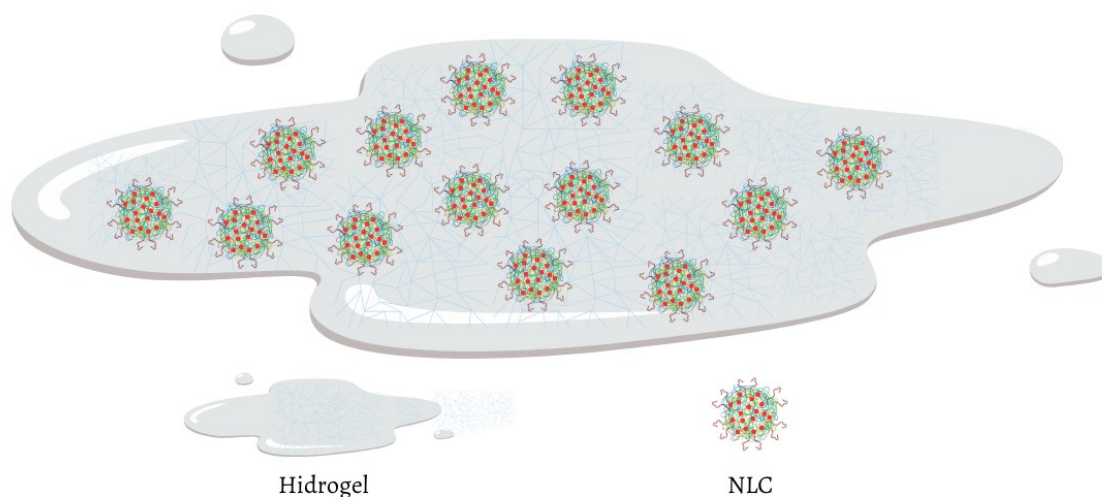


Figura 7. Representação esquemática do hidrogel contendo as nanoformulações. Criado com *software* Canva (2023).

A análise de varredura de taxa de cisalhamento revelou a influência das nanopartículas na rede estrutural dos hidrogéis. Os hidrogéis contendo as formulações NLC_{controle}, NLC_{VB} e NLC_α apresentaram viscosidades semelhantes a formulação em creme de VB disponível comercialmente (VB_{comercial}) e o hidrogel. O hidrogel com NLC_{VBa} apresentou viscosidade significativamente maior ($p < 0,001$) que VB_{comercial}. Os dados obtidos de viscosidade de todos os hidrogéis analisados exibiram um comportamento pseudoplástico de modo semelhante ao creme VB_{comercial} (Figura 8).

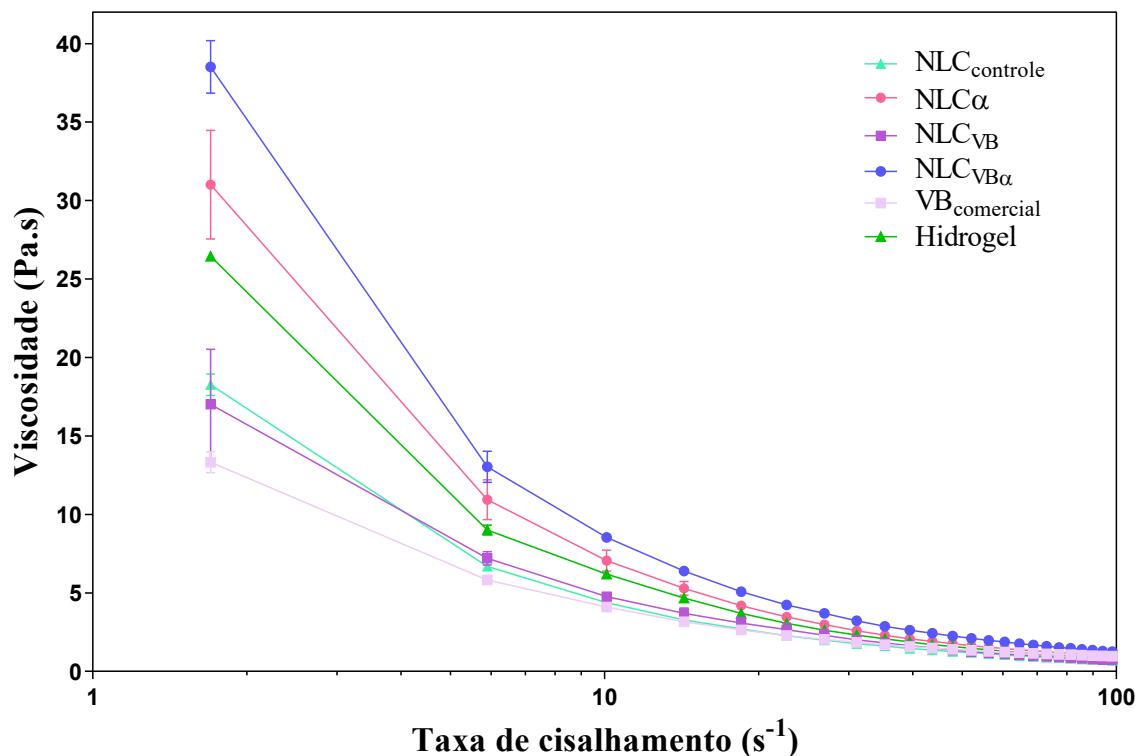


Figura 8. Determinação das propriedades viscoelásticas dos hidrogéis de xantana-colágeno preparados com a incorporação das NLC_{controle}, NLC_{VB}, NLC_α ou NLC_{VBα}, utilizando reometria oscilatória, com temperatura constante (25 °C).

5.8 Avaliação dos parâmetros clínicos

Os animais foram sensibilizados com DNCB 0,5% e, sem seguida, desafiados com DNCB 0,5% sendo, posteriormente, tratados topicamente com o hidrogel contendo as diferentes formulações desenvolvidas. Ao longo desse período, foram analisados os sintomas clínicos como eritema, edema, escoriação e secura da pele dos camundongos.

A Figura 9A mostra as características clínicas das lesões nas orelhas dos camundongos após 25 dias de protocolo experimental. Animais do grupo DNCB, que não recebeu nenhum tipo de tratamento, desenvolveram lesões enquanto os animais tratados com o hidrogel contendo NLC_{VB}, NLC_{VBα} e VB_{comercial} apresentaram melhora clínica das lesões semelhante a DA.

Observando as pontuações atribuídas à gravidade da dermatite (Figura 9B) foi possível notar que no 16º dia, o grupo que não recebeu nenhum tratamento (DNCB), o tratado com NLC_α ou com o hidrogel, já começaram a apresentar índices

RESULTADOS

significativamente maiores que o grupo controle ($p < 0,01$; $p < 0,0001$ e $p < 0,01$, respectivamente).

No 20º dia, as lesões se agravaram significativamente, evoluindo para quadro de escoriações e secura, tanto nos grupos DNCB, NLC_{α} ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$) e hidrogel ($p < 0,05$), quanto no grupo $NLC_{controle}$ ($p < 0,001$). Nesse mesmo dia, os animais tratados com o hidrogel contendo NLC_{VB} , $NLC_{VB\alpha}$ e $VB_{comercial}$ apresentaram melhora clínica significativa dos sintomas quando comparados com o grupo DNCB ($p < 0,05$).

No 24º dia, os grupos DNCB, $NLC_{controle}$, NLC_{α} e hidrogel evoluíram para lesões graves ($p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente), porém a aplicação de formulações de hidrogel contendo NLC_{VB} , $NLC_{VB\alpha}$ e $VB_{comercial}$ foi eficaz na melhora dos sinais clínicos da DA ($p < 0,01$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

A Figura 9C mostra que a melhora significativa dos sinais clínicos, que proporcionaram a redução do índice total, ao final do tratamento ocorreu porque as pontuações foram reduzidas para todos os parâmetros clínicos analisados (eritema/hemorragia, edema, secura/descamação, escoriação/erosão).

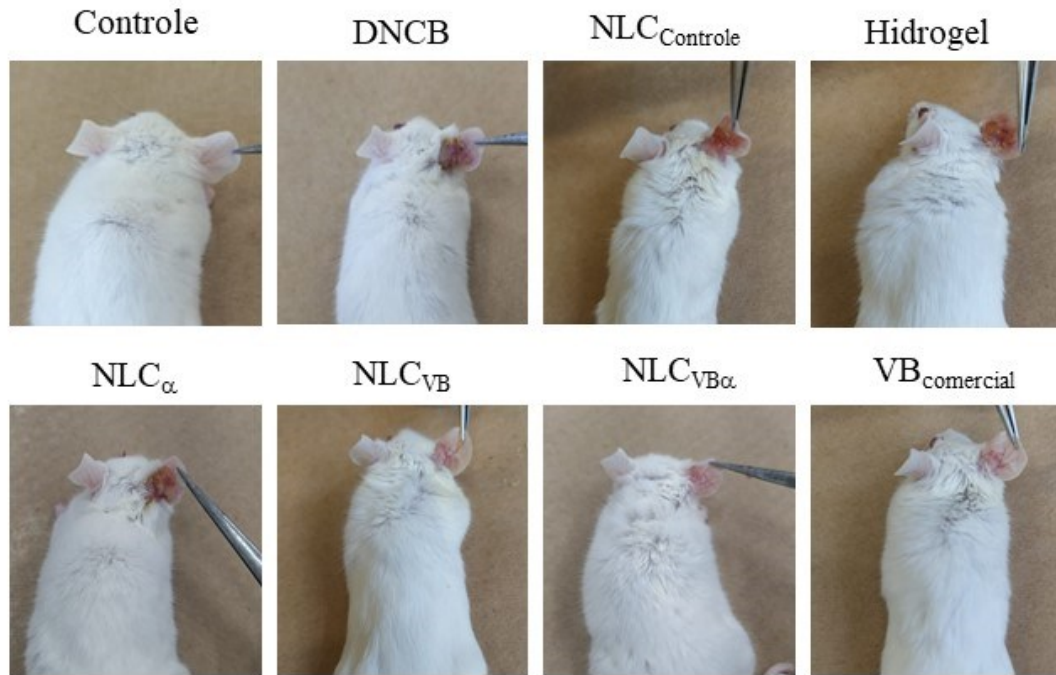
Corroborando com os dados apresentados no *score* de DA, no 20º dia experimental foi possível notar um aumento significativo da espessura das orelhas dos animais do grupo DNCB e $NLC_{controle}$ ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) quando comparado ao grupo dos animais controle que não foram induzidos ao desenvolvimento da DA (Figura 9D). Em relação ao grupo DNCB, os animais tratados com NLC_{VB} , $NLC_{VB\alpha}$ e $VB_{comercial}$ tiveram redução significativa do edema de orelha ($p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente).

No 24º dia, com o agravamento das lesões as orelhas dos camundongos dos grupos DNCB, $NLC_{controle}$ e NLC_{α} aumentaram o edema significativamente em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$; $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os grupos tratados com NLC_{VB} , $NLC_{VB\alpha}$ e $VB_{comercial}$ apresentaram espessura de orelha semelhantes ao grupo controle não induzido.

Os animais também foram analisados quanto ao peso ao longo de todo protocolo experimental (Figura 9E). Os dados mostraram redução significativa ($p < 0,01$) de peso apenas no grupo dos animais tratados com a formulação comercial de VB ($VB_{comercial}$).

RESULTADOS

A



B

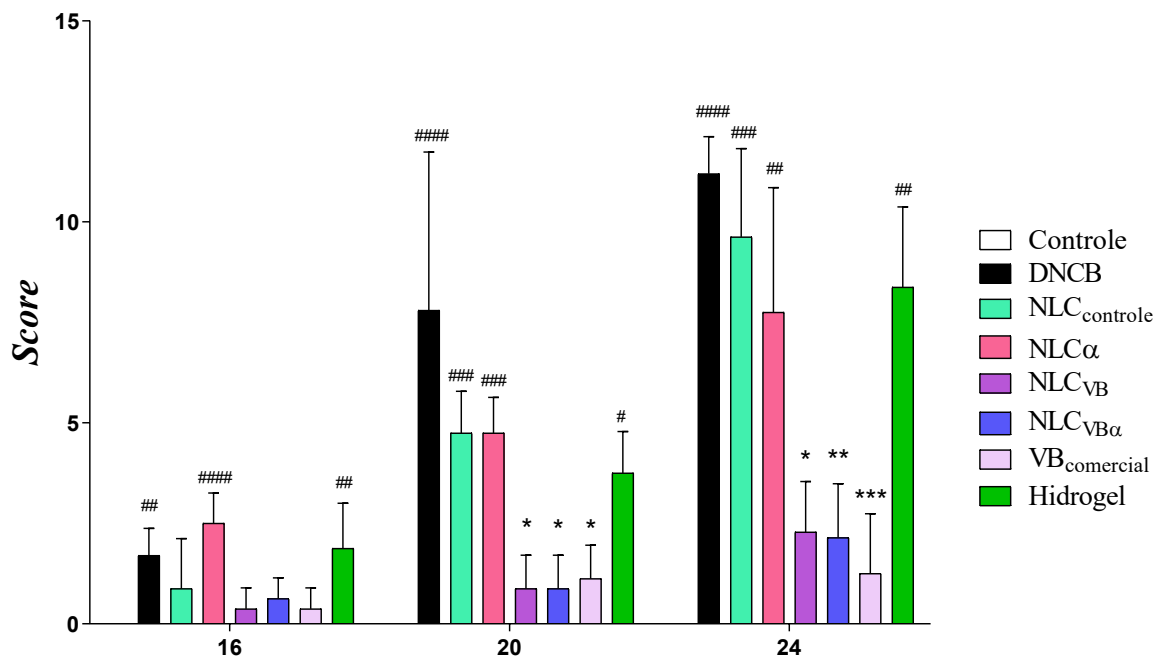
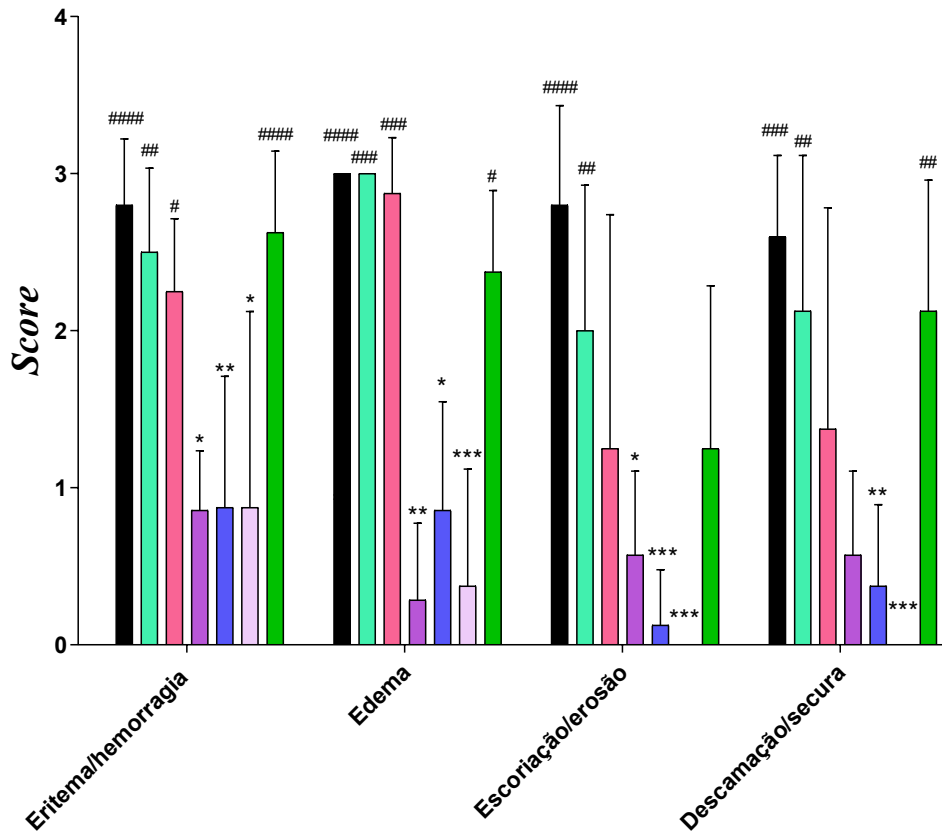


Figura 9 (continuação)

C



D

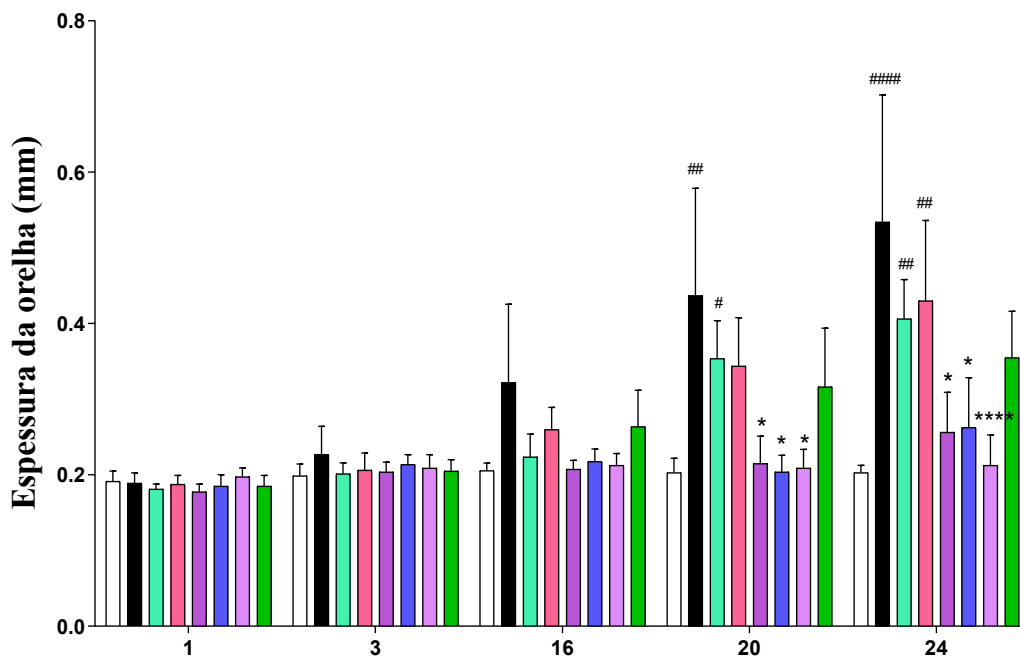


Figura 9 (continuação)

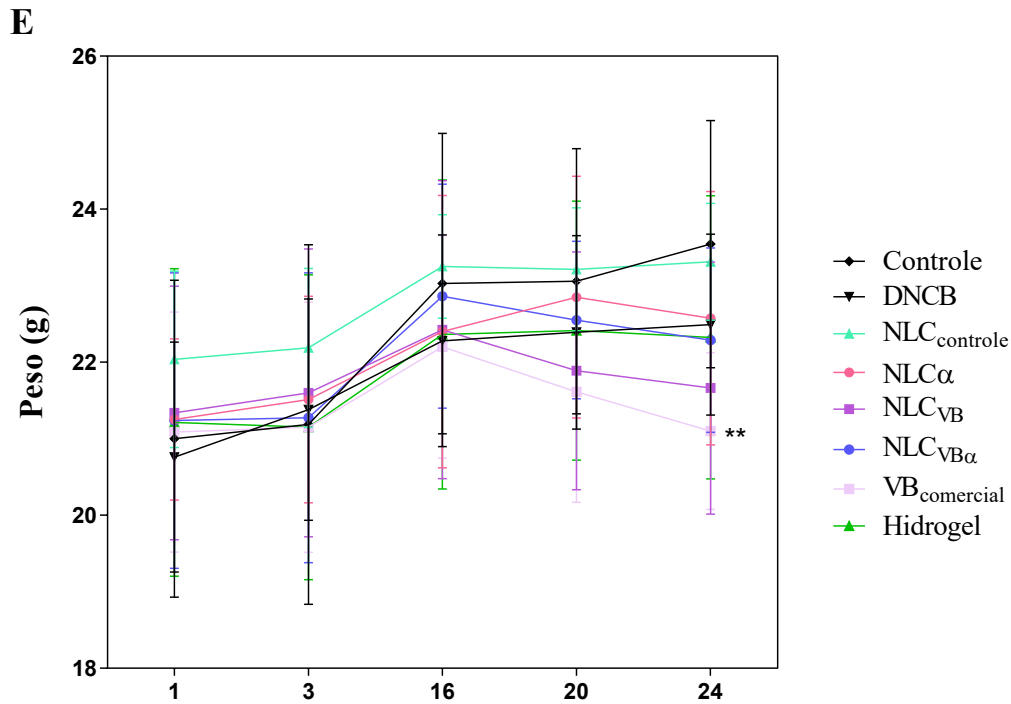


Figura 9. Avaliação clínica da DA experimental. **(A)** Imagens das lesões nas orelhas dos camundongos no último dia experimental. **(B)** *score* de DA ao longo do tratamento **(C)** *score* de DA por parâmetro clínico no dia 24, **(D)** espessura da orelha e **(E)** peso dos camundongos tratados com diferentes hidrogéis híbridos ao longo do protocolo experimental. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal wallis com teste de comparação múltipla de Dunn. Diferenças estatísticas em relação ao grupo DNCB são representadas por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ e em relação ao grupo controle por # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$.

5.9 Análise histopatológica das lesões de DA

Os dados histopatológicos dos tecidos corados com H&E permitiram evidenciar que os animais do grupo DNCB, NLC_{controle}, Hidrogel e NLC α apresentaram hiperplasia e intenso infiltrado inflamatório no tecido da orelha comparado ao grupo controle (Figura 10). Diferentemente, os tecidos epidérmicos dos grupos de animais tratados com o hidrogel com NLC_{VB}, NLC_{VB α} e a formulação comercial (VB_{comercial}) mostraram redução da espessura da epiderme e do infiltrado inflamatório. Corroborando com esses dados, pela marcação com azul de toluidina (Figura 11A) foi demonstrada redução significativa no número de mastócitos ($p < 0,001$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) nos grupos NLC_{VB}, NLC_{VB α} e VB_{comercial} (Figura 11B).

RESULTADOS

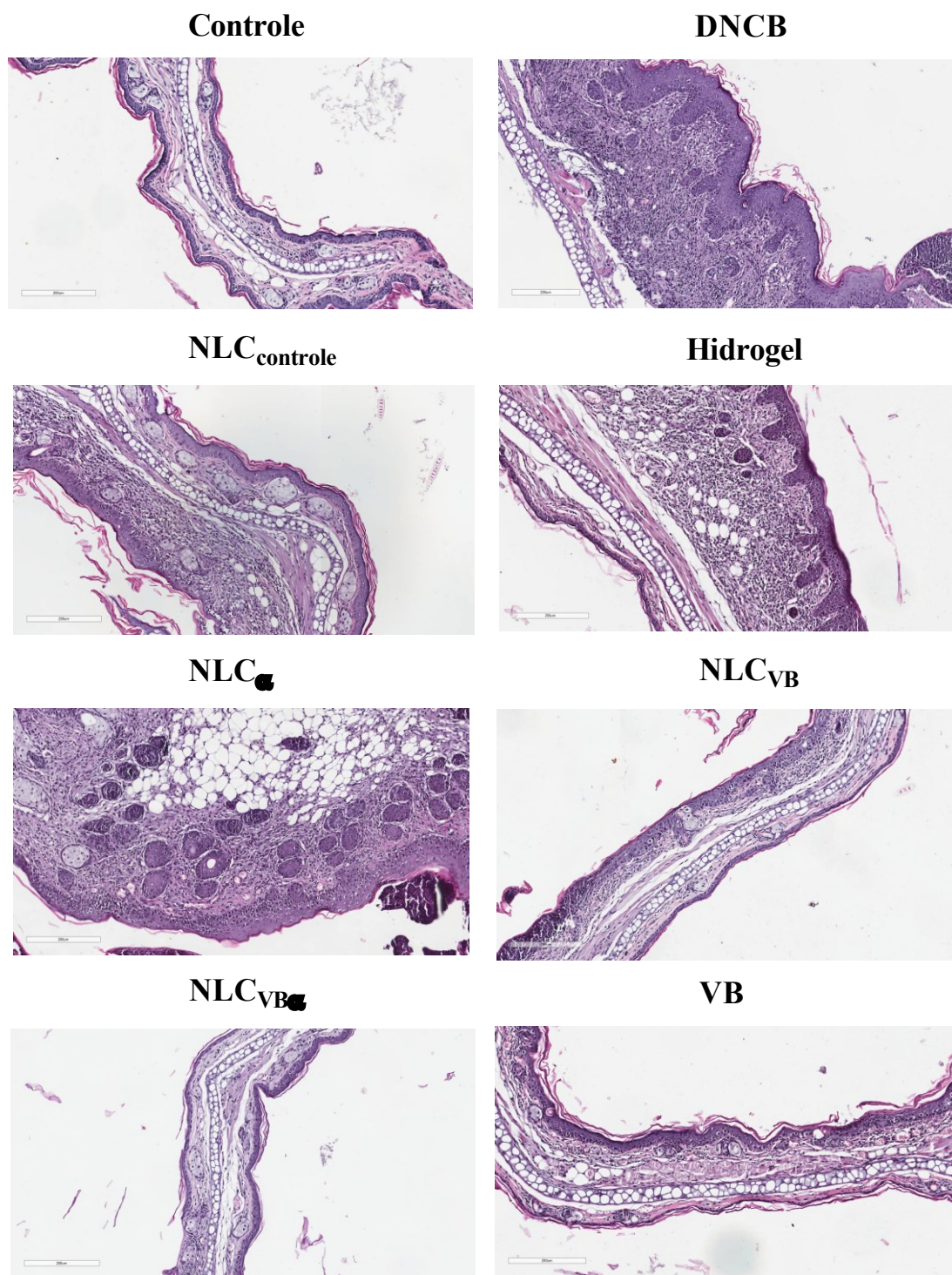
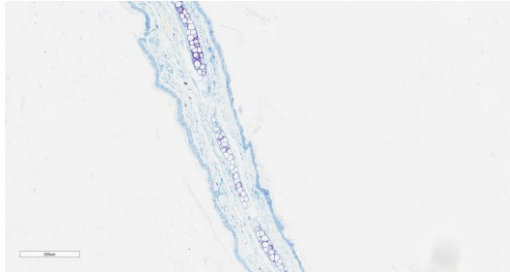


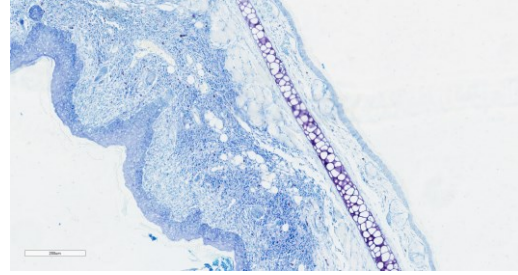
Figura 10. Perfil histológicos da orelha de camundongos tratados com diferentes hidrogéis contendo compostos de fármacos valerato de betametasona e/ou α -tocoferol nanoencapsulados em NLCs, em modelo de DA. As secções foram coradas com H&E (aumento de 100x). Escala das barras: 200 μ M.

A

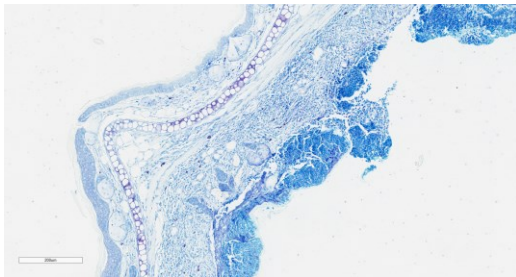
Controle



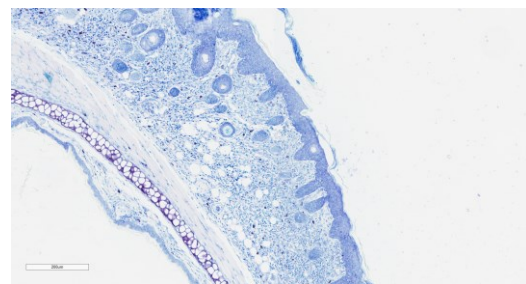
DNCB



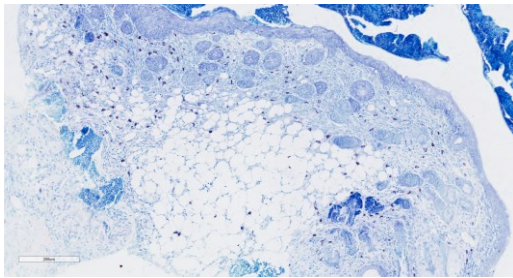
NLC_{controle}



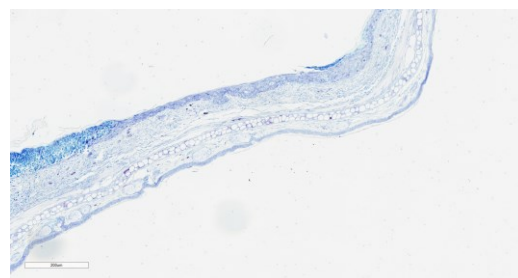
Hidrogel



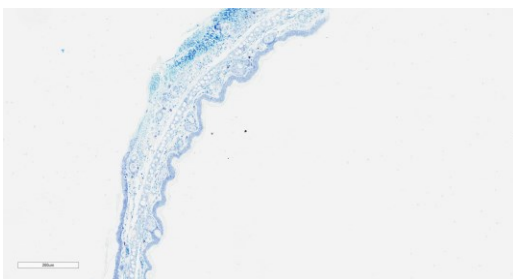
NLC_■



NLC_{VB}



NLC_{VB}■



VB

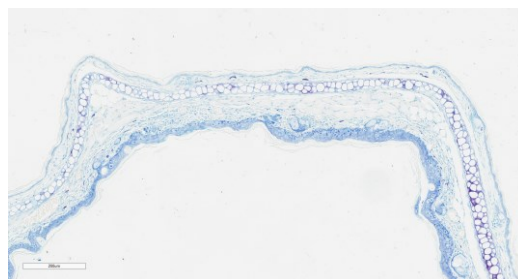


Figura 11 (continuação)

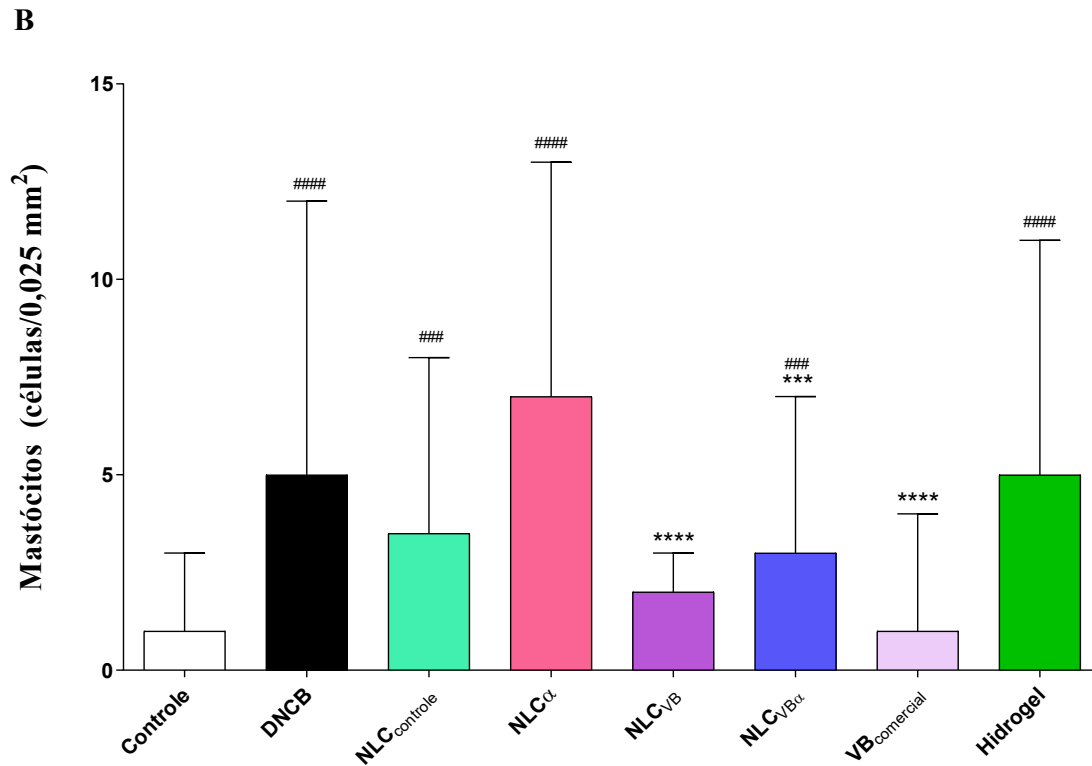


Figura 11. Infiltrado de mastócitos na orelha dos camundongos tratados com diferentes hidrogéis em modelo de DA corado com azul de toluidina (A) (aumento de 100x). O número de mastócitos foi observado em três lâminas de animais diferentes (B). As setas vermelhas indicam os mastócitos. Escala das barras: 64 μ M. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann Whitney, representadas por * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, quando comparadas com o grupo DNCB e #### $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

5.10 Quantificação de IgE total

Por meio do ensaio de ELISA para determinação dos níveis de IgE total foi demonstrado que os desafios com DNCB induzem ao aumento significativo da produção de IgE ($p < 0,001$) em homogenato do tecido de orelha e soro (Figura 12) e a exceção foi reportada apenas em amostras de homogenato do grupo de animais tratados com a formulação comercial ($p < 0,05$).

RESULTADOS

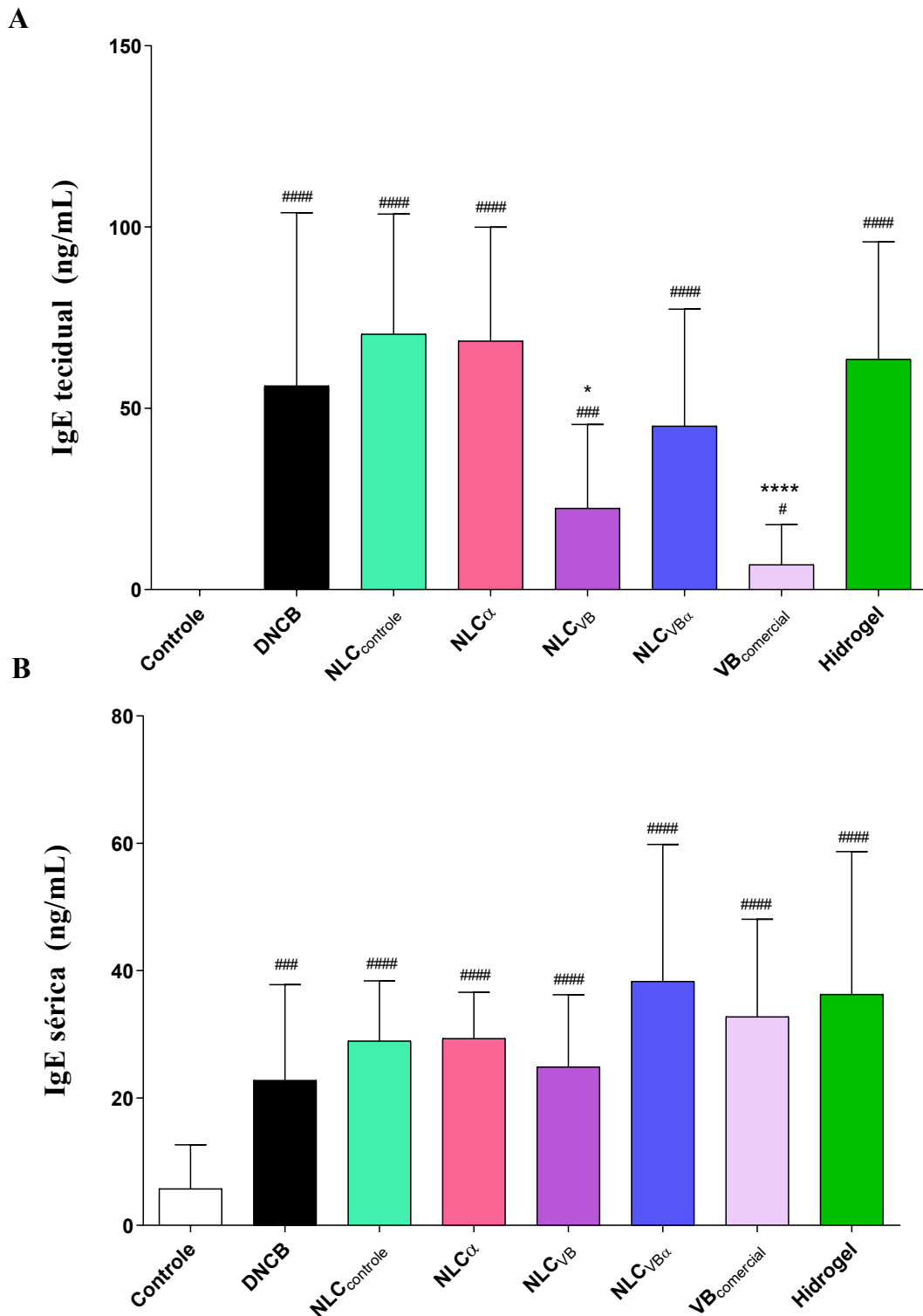


Figura 12. Efeito do tratamento com diferentes hidrogéis na concentração de IgE total mensurados por ELISA em amostras de homogenato de tecido de orelha (A) e no soro (B) de camundongos, em modelo experimental de DA. Os dados estão representados como a média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann Whitney, representadas por * $p < 0,05$, quando comparadas com o grupo DNCB e ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle.

5.11 Quantificação de citocinas

Os níveis de citocinas IFN γ , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-10, IL-2 e TNF α no homogenato de orelha foram determinados por CBA. A aplicação tópica de DNCB no modelo experimental de DA induz um aumento significativo ($p < 0,01$) dos níveis de IL-4, IL-6 e TNF α (Figura 13). Quando os animais são tratados com as formulações do hidrogel contendo NLC_{VB}, NLC_{VB α} e VB_{comercial} a produção de IL-4 é inibida ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente). Quanto aos níveis de IL-6, foi possível notar que além dos animais tratados com NLC_{VB}, NLC_{VB α} e VB_{comercial}, os grupos NLC_{controle} e NLC α também apresentaram redução significativa dessa citocina ($p < 0,05$). De maneira semelhante, o tratamento com NLC_{VB}, NLC_{VB α} , VB_{comercial}, NLC_{controle} ($p < 0,01$) e NLC α ($p < 0,05$) também inibiram a produção de TNF α . Não foram detectados níveis de IFN γ , IL-17A, IL-10 e IL-2 nas amostras analisadas.

RESULTADOS

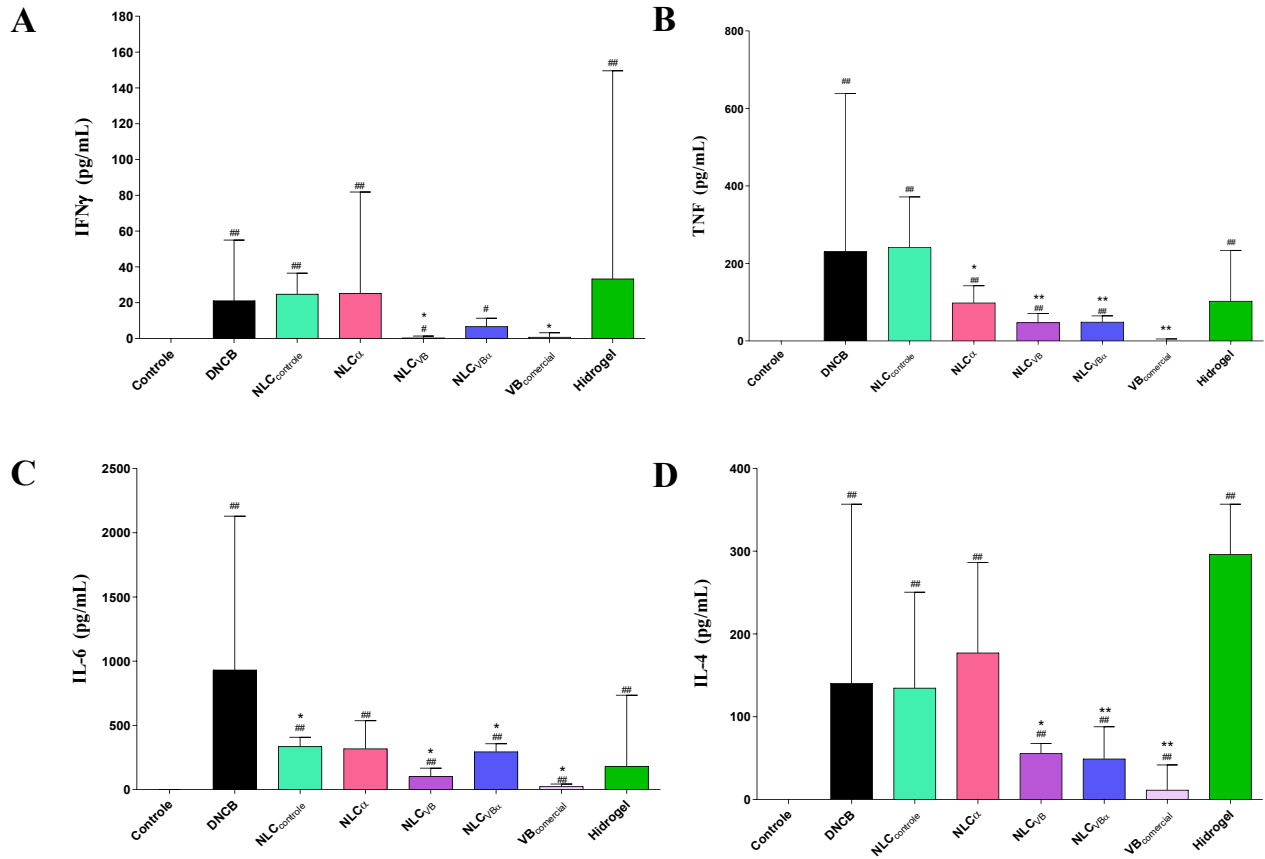


Figura 13. Efeito do tratamento com diferentes hidrogéis híbridos na concentração das citocinas IFN γ , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-10, IL-2 e TNF α nas amostras de homogenato de tecido de orelha de camundongos com DA experimental, analisadas por citometria de fluxo. Os dados estão representados como mediana \pm variância. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann Whitney, representadas por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparadas com o grupo DNCB e ## $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

6. Discussão

A DA apresenta uma elevada importância para saúde pública, sendo considerada a doença crônica inflamatória de pele mais prevalente globalmente, especialmente relatada em países mais industrializados, indicando que fatores ambientais e o estilo de vida também estão contribuindo para o aumento da incidência da doença. Ela afeta homens e mulheres de todas as etnias, crianças e adultos, sendo mais frequente em famílias com outros distúrbios atópicos (asma e/ou rinite alérgica) (MAYBA; GOODERHAM; SURGERY, 2017; TORRES, T.; FERREIRA, E.; GONÇALO, M.; MENDES-BASTOS, P. *et al.*, 2019).

Emolientes para reduzir a secura da pele, corticosteroides tópicos para inflamação da pele e anti-histamínicos de uso oral para reduzir o prurido estão entre as terapias de primeira linha da DA, que podem ser complementadas por tratamentos adjuntos como o uso de corticosteroides orais de curto prazo, ciclosporina sistêmica e radiação UV e até mesmo o uso de imunobiológicos como dupilumab. No entanto, apesar da eficácia comprovada desses tratamentos tradicionais, o uso frequente está associado ao aumento dos efeitos adversos, limitando a adesão do paciente a essas terapias (SINGH; BEHL; SHARMA; ZAHOR *et al.*, 2022).

Diante deste cenário, as formulações à base de nanotecnologia têm sido extensivamente estudadas para a entrega tópica de diferentes tipos de medicamentos, com a finalidade de melhorar a entrega, melhorando a efetividade do tratamento das doenças de pele, inclusive da DA. A nanoencapsulação apresenta algumas vantagens quanto às formulações tradicionais como a redução da frequência de aplicação, aumento solubilidade do fármaco, restringe a veiculação dos fármacos ao estrato córneo, epiderme e derme, aumenta a biodisponibilidade e diminui a toxicidade sistêmica, que por consequência, diminui os efeitos colaterais do tratamento (CLÁUDIA PAIVA-SANTOS; GAMA; PEIXOTO; SOUSA-OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Dessa forma, o objetivo deste estudo é propor um novo produto utilizando a nanotecnologia para encapsulação do α -tocoferol e/ou VB e avaliar a eficácia dessas formulações no uso tópico para o tratamento da DA. Um dos desafios da encapsulação desses compostos para análise nesse estudo, deve-se à baixa solubilidade em meio aquoso. Considerando a experiência prévia do grupo no preparo de nanocarreadores com fármacos hidrofóbicos e as características dos compostos escolhidos para o desenvolvimento da formulação, foi decidido incorporar o α -tocoferol e/ou VB em NLCs (DE MOURA; RIBEIRO; DE CARVALHO; RODRIGUES DA SILVA *et al.*, 2021b;

GUILHERME; RIBEIRO; ALCÂNTARA; CASTRO *et al.*, 2019; RODRIGUES DA SILVA; GERONIMO; GARCÍA-LÓPEZ; RIBEIRO *et al.*, 2020).

A escolha dos lipídeos e o surfactante, bem como a proporção dos mesmos para o preparo dos NLCs, foram baseados em um estudo anterior publicado pelo grupo (DE MOURA; RIBEIRO; DE CARVALHO; RODRIGUES DA SILVA *et al.*, 2021a). Para o encapsulamento de VB foi utilizada a mesma concentração do fármaco disponível nas formulações comerciais disponíveis.

Atualmente ainda existem poucos estudos com a nanoencapsulação de α -tocoferol, por esse motivo, a concentração utilizada neste estudo foi escolhida baseada em dois estudos disponíveis na literatura. O estudo desenvolvido por Praça *et al.*, elaborou uma microemulsão com 0,1 % de vitamina E em sua formulação, com baixa estabilidade após 30 dias de fabricação, por esse motivo e considerando que utilizaríamos um nanocarreador diferente, optamos por aumentar a concentração do α tocoferol para 0,5%, visando aumentar a estabilidade que foi apresentada neste estudo (PRAÇA; VIEGAS; PEH; GARBIN *et al.*, 2020).

O trabalho de Ma *et al.* apresentou várias formulações de NLC contendo em concentrações de 5 e 10% de α -tocoferol, no entanto, nesse trabalho não foram realizados testes *in vitro* ou *in vivo* para avaliação de biocompatibilidade da aplicação tópica dessas formulações (MA; WANG; LIN; LUO *et al.*, 2007). Nossos dados de avaliação de citotoxicidade mostraram que NLCs contendo concentrações acima de 1,5 mM apresentaram alta toxicidade para queratinócitos, indicando que concentrações altas poderiam resultar em elevada toxicidade para aplicação tópica.

A caracterização dos NLCs envolve técnicas que avaliam características físico-químicas que permitam estudar seu desempenho, qualidade e estabilidade. São avaliados diversos parâmetros como tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão, morfologia, pH e eficiência de encapsulamento que esclarecem sobre a viabilidade da utilização da NLC como sistema de entrega de drogas (CHAUHAN, I.; YASIR, M.; VERMA, M.; SINGH, A. P., 2020).

Estes nanocarreadores podem ser desenvolvidos por diversas metodologias (SAEZ; SOUZA; MANSUR, 2018), sendo a metodologia de ultrasonicação, a técnica escolhida para a produção dos NLCs utilizados nesse estudo. A análise de tamanho dos nanocarreadores feita por DLS, demonstrando que as formulações produzidas de NLC_{VB} apresentaram um tamanho de aproximadamente $190,8 \pm 1,5$ nm. De modo semelhante,

um estudo desenvolveu NLCs para entrega de VB, com tamanho médio de $186, 2 \pm 8, 4$ nm (MAHMOOD; RAPALLI; WAGHULE; GORANTLA *et al.*, 2020).

Outro trabalho, utilizando a técnica de homogeneização de alta pressão em temperatura elevada para o encapsulamento de VB, produziram partículas de tamanhos menores variando entre 132.9 ± 0.65 nm e 183 ± 0.19 nm, mas com a utilização de surfactante e co-surfactante aniônico na formulação (NAGAICH; GULATI, 2018). Apesar da adição de co-surfactantes contribuir para a redução do tamanho das partículas, podem aumentar a variabilidade do tamanho das partículas durante o armazenamento e a toxicidade do sistema dependendo do tipo de surfactante (KARN-ORACHAI; SMITH; PHUNPEE; TREETHONG *et al.*, 2014; MAUPAS; MOULARI; BÉDUNEAU; LAMPRECHT *et al.*, 2011).

Estudos mostram que nanopartículas derivadas de tensoativos não iônicos, como o poloxâmero 188 não apresentaram citotoxicidade, enquanto tensoativos iônicos, especialmente os catiônicos, demonstram citotoxicidade atribuída a atração eletrostática com a membrana celular carregada negativamente (LHERM; MÜLLER; PUISIEUX; COUVREUR, 1992; SCHÖLER; OLBRICH; TABATT; MÜLLER *et al.*, 2001).

Estudos de absorção do VB em pele humana excisada relataram a importância da associação entre o fármaco e seu carreador, especialmente na localização do fármaco dentro da matriz lipídica para o direcionamento epidérmico (SIVARAMAKRISHNAN; NAKAMURA; MEHNERT; KORTING *et al.*, 2004). A localização do fármaco no carreador pode ser influenciada por propriedades físico-químicas do fármaco, o tipo de surfactante e concentração, tipo de lipídio e método de produção. Por isso, além de boa tolerabilidade, simplicidade de produção em larga escala, baixo custo, estabilidade, direcionamento, liberação controlada de medicamentos e proteção de drogas da degradação, é muito importante que a droga seja solúvel na matriz lipídica (MÜLLER; SOUTO; ALEMIEDA, 2007).

Analisando o tamanho do NLC vazio (NLC_{controle}) e o NLC com a incorporação do VB (NLC_{VB}) e do α -tocoferol (NLC _{α}) foi possível notar que a incorporação do fármaco reduziu o tamanho médio das partículas. De modo semelhante, um estudo demonstrou os NLCs com a incorporação de 5% de α -tocoferol às formulações resultaram em redução do tamanho de 289 nm para 156 nm. Além disso, foi demonstrado que o aumento da concentração do α -tocoferol por si, reduz o tamanho dos nanocarreadores (IJAZ; AKHTAR, 2020).

Em nosso trabalho, o α -tocoferol, um lipídeo líquido, foi incorporado diretamente na matriz da NLC. Acreditamos que a justificativa para a redução do tamanho na encapsulação do VB e α -tocoferol, deve-se à uma maior interação físico-química destes compostos ao seu carreador, sendo incorporados à matriz lipídica, visto que, no NLC isso é possibilitado pela presença de lipídios líquidos em sua composição, que solubiliza as drogas em uma extensão muito maior do que os lipídios sólidos (MÜLLER; SOUTO; ALEMIEDA, 2007).

Na formulação preparada para o *co-delivery* de α -tocoferol e VB, foram observados tamanhos significativamente maiores que NLC_{controle}, mas baixos índices de PDI ($0,190 \pm 0,031$) e alta eficiência de encapsulamento de VB ($98,0 \pm 0,3$). Como o preparo do NLC _{α} e NLC_{VB α} permitiu a incorporação direta do α -tocoferol na matriz lipídica do nanocarreador, não foi possível avaliar %EE nessas formulações.

Com relação à distribuição do tamanho das partículas, considera-se que quanto menor o PDI, maior é a estabilidade a longo prazo. O PDI igual a 0 seria para partículas idealmente monodispersas, um PDI de 0,100 indica uma distribuição numa faixa bem estreita enquanto valores de PDI > 0,500 indica uma distribuição muito ampla (PIMENTEL-MORAL; TEIXEIRA; FERNANDES; BORRÁS-LINARES *et al.*, 2019). Todas as formulações desenvolvidas neste estudo revelaram uma população mais homogênea e com baixa variabilidade (PDI < 0,20).

As formulações desenvolvidas para carrear o α -tocoferol apresentaram PDI = $0,186 \pm 0,016$, valores menores que os apresentados em outros dois estudos disponíveis que objetivavam a utilização tópica dos NLCs. O primeiro estudo produziu NLCs pelo método de homogeneização à quente, gerando partículas com PDI = 0,278, utilizando 5% de tocoferol na sua formulação (IJAZ; AKHTAR, 2020). No segundo estudo, os NLCs foram produzidos pela técnica de homogeneização de alta pressão, com a incorporação de 0,1 % de α -tocoferol resultando em nanocarreadores com PDI = 0,2 (ABLA; BANGA, 2014).

As formulações desenvolvidas para o VB também revelaram uma população monodispersa (PDI = $0,176 \pm 0,006$), com maior eficiência de encapsulação ($98,3 \pm 0,1$), quando comparado ao trabalho desenvolvido por Nagaich e Gulati (2018), onde as formulações de NLC apresentaram PDI de 0,58 a 0,601 e eficiência de encapsulamento entre $72,27 \pm 0,34$ e $76,48 \pm 1,23$ (NAGAICH; GULATI, 2018).

Em aplicações farmacêuticas, o tamanho e a dispersão das nanopartículas são parâmetros cruciais para garantir um comportamento ideal da formulação em termos de estabilidade, chegada ao local de ação, entrega e segurança (ORTIZ; YAÑEZ; SALAS-HUENULEO; MORALES, 2021). Nesse sentido, nosso trabalho é o primeiro estudo na literatura que descreve o tamanho e concentração dos NLCs por NTA no encapsulamento de VB e/ou α -tocoferol.

Por NTA das formulações produzidas permitem evidenciar perfis de tamanho semelhantes, mas relativamente menores do que foi apresentado pelo DLS. O NTA apresenta algumas vantagens em relação ao DLS especialmente no dimensionamento mais preciso, maior confiabilidade na distribuição dos tamanhos e facilidade na detecção de contaminantes (FILIFE; HAWE; JISKOOT, 2010).

Através do NTA também é possível visualizar e monitorar a trajetória das nanopartículas em movimento browniano em tempo real. É uma ferramenta útil para a nanotecnologia aplicada à área farmacêutica, pois permite determinar a concentração de partículas. As formulações produzidas neste trabalho obtiveram concentração na ordem de 10^{13} moléculas/mL, indicando um bom rendimento e fornecendo informações valiosas para entender as doses de fármaco transportadas pelos nanocarreadores (ORTIZ; YAÑEZ; SALAS-HUENULEO; MORALES, 2021).

O PZ descreve o potencial eletroforético, sendo um parâmetro que avalia as cargas da interface de superfície e da camada de hidratação das partículas em meio aquoso. Essa medida indica a magnitude de repulsão ou atração eletrostática entre as partículas traduzindo o potencial de estabilidade das partículas em dispersão (BHATTACHARJEE, 2016; DOANE; CHUANG; HILL; BURDA, 2012). O PZ das formulações apresentaram valores entre $-25,9 \pm 0,90$ e $-34,1 \pm 0,87$ mV compatível com formulações estáveis, que apresentam repulsão de cargas entre as partículas, impedindo a agregação (HAN; LI; YIN; LIU *et al.*, 2008).

O pH das formulações de NLCs foram ligeiramente ácidos, com pH variando entre 6 e 7. O pH da superfície da pele, mais especificamente do estrato córneo, da maioria das partes do corpo é ácido, com pH entre 4,1 e 5,8, com pequenas variações entre face, tronco e extremidades (LAMBERS; PIESSENS; BLOEM; PRONK *et al.*, 2006; SEGGER; ABMUS; BROCK; ERASMY *et al.*, 2008) e se aproxima de valores mais neutros, em torno de 7 a 7,4, em camadas mais profundas (SCHREML; MEIER; WOLFBEIS; LANDTHALER *et al.*, 2011; TURNER; CULLANDER; GUY, 1998).

O pH ácido do estrato córneo parece ser essencial para a integridade de barreira epitelial e defesa antimicrobiana, pois a ruptura física experimental da epiderme levou ao aumento do pH da pele (PROKSCH, 2018). Dessa forma, as alterações de pH apresentam um papel importante na patogênese de doenças de pele, como por exemplo a DA. Por isso, a normalização do pH por acidificação através de tratamentos tópicos contribui para o estabelecimento da microbiota fisiológica, o reparo da barreira cutânea, diferenciação epidérmica além de reduzir a inflamação (PROKSCH, 2018). Portanto, o uso de agentes de limpeza e pomadas com pH levemente ácidos podem ser relevantes para prevenção e tratamento de doenças de pele (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006).

Para determinar a forma e a morfologia dos NLCs, eles foram observados por TEM. As imagens mostraram NLCs em formato esférico, com distribuição de tamanhos monodispersos entre as amostras analisadas, indicando boa reprodutibilidade das formulações. Uma pequena diferença de tamanho visual pode ser observada entre os grupos analisados por TEM em relação aos dados apresentados pelo DLS. No entanto, é importante mencionar que essa diferença ocorre porque as imagens de TEM revelam o tamanho dos NLCs em estado sólido, após secagem, podendo, as nanopartículas adquirirem tamanhos diferentes (TSAI; WU; HUANG; CHANG *et al.*, 2012).

Em geral, parâmetros físicos como tamanho, baixos índices de PDI e uma faixa de PZ de até ± 35 mV são características essenciais para obter boa estabilidade coloidal (SUKHANOVA; BOZROVA; SOKOLOV; BERESTOVOY *et al.*, 2018). Para estudo da estabilidade, as formulações de NLCs desenvolvidas foram monitoradas para a avaliação desses parâmetros por 12 meses, a 4, 25 e 40 °C.

Ao longo do período de análise nenhuma das formulações apresentaram diferenças significativas nos valores de PDI. Analisando a temperatura de 4°C para armazenamento, as formulações NLC_{controle}, NLC α e NLC_{VB} apresentaram aumento significativo do tamanho das partículas. O aumento do tamanho das partículas pode ocorrer por vários fatores: separação gravitacional, floculação ou mecanismos de aparecimento de cristais de Ostwald (NAKACH; AUTHELIN; TADROS; GALET *et al.*, 2014). A clássica teoria da cinética de crescimento de cristais de Ostwald é geralmente utilizada para processos de formação de cristais controlados por difusão, onde partículas maiores crescem às custas das menores (ZHANG; HUANG; LIN, 2010).

Neste trabalho, o aumento do tamanho dos NLCs a 4°C embora visualmente sugestivo de formação de aglomerados floculares, não promoveu alteração de PDI. Uma redução significativa de PZ foi observado apenas para a formulação NLC_{VB} no último

mês de análise. Nesse caso, é possível que o aumento do tamanho corresponda a sutis aglomerações homogêneas (BASHIRI; GHANBARZADEH; AYASEH; DEHGHANNYA *et al.*, 2020).

Curiosamente, a formulação NLC_{VB α} se manteve estável até o 10º mês de análise a 4°C, apresentando redução significativa de tamanho a partir do 2º mês, quando elevada a 40°C. Na temperatura de 25°C, as formulações NLC_{controle}, NLC α e NLC_{VB} apresentaram boa estabilidade ao longo dos 12 meses enquanto NLC_{VB α} , apenas no 10º mês teve alterações significativas de tamanho e PZ. Por isso, considerando o maior tempo de estabilidade para todas as formulações desenvolvidas, recomenda-se o armazenamento dos NLCs a 25°C e o uso da formulação com NLC_{VB α} em até 10 meses após produção.

Avaliar a biocompatibilidade das formulações de liberação de fármacos é essencial, por isso ensaios realizados em linhagens celulares são amplamente aceitos como primeiros indicadores de toxicidade e fornecem informações muito úteis (DOKTOROVÁ, SLAVOMIRA; KOVAČEVIĆ, ANDJELKA B.; GARCIA, MARIA L.; SOUTO, ELIANA B., 2016; GASPAR; DUNCAN, 2009). Neste trabalho, os ensaios *in vitro* realizados com as formulações permitiram avaliar o potencial citotóxico dos NLCs sob dois aspectos diferentes: a concentração dos nanocarreadores e a molaridade dos componentes livres e encapsulados em queratinócitos humanos.

Analisando a concentração dos nanocarreadores, apenas o estímulo com 10¹³ NLC_{VB}/mL foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células HaCat em 24 horas de estímulo, demonstrando considerável biocompatibilidade do sistema mesmo em altas concentrações de NLCs. Um estudo anterior mostra que os corticosteroides tópicos reduzem o crescimento celular de maneira dose dependente e que VB interrompe o ciclo celular e induz apoptose de células HaCat (GUICHARD; HUMBERT; TISSOT; MURET *et al.*, 2015). De modo similar, observamos que a viabilidade das células HaCat foi reduzida com o aumento da concentração com o estímulo com VB.

Interessantemente, nosso estudo mostra que, quando a análise da viabilidade celular é feita com relação a concentração do fármaco, o encapsulamento de VB reduz significativamente a citotoxicidade apresentada pelo fármaco livre em 24 e 72 horas de estímulo. Adicionalmente, esses dados mostram que as formulações de NLC_{VB} aumenta em 2,7 vezes a concentração de IC50 em relação ao fármaco livre.

Um ensaio de viabilidade celular desenvolvido em fibroblastos estimulados com nanopartículas e lipossomas contendo VB mostrou que uma redução intensa de células

viáveis na concentração de 2 mM após 24 horas de estímulo (EROĞLU; AZIZOĞLU; ÖZYAZICI; NENNI *et al.*, 2016). Nossos dados, entretanto, mostram uma redução significativa da viabilidade celular apenas em concentrações maiores que 2,5 mM (34,35% de células viáveis) após 24 horas de estímulo. Essas análises sugerem uma superioridade das NLCs no encapsulamento do fármaco em relação a utilização de lipossomos e nanopartículas para a redução da citotoxicidade do VB.

Além disso, foi possível observar que a citotoxicidade aumenta de acordo com o tempo de exposição ao estímulo com NLC_{VB}, sugerindo uma liberação lenta e controlada do fármaco. Estudos de encapsulação em NLC e lipossomas demonstraram *in vitro* uma liberação bifásica de VB, sendo uma fase de liberação relativamente rápida seguida por uma fase estável com taxa de liberação mais lenta e reduzida (MAHMOOD; RAPALLI; WAGHULE; GORANTLA *et al.*, 2020; MOHAMED; KASSEM; KHALIL; YOUNIS *et al.*, 2021; NAGAICH; GULATI, 2018).

Neste contexto, ambas as fases de liberação do fármaco são interessantes para aplicação tópica. A liberação moderada inicial favorece um aumento de penetração do fármaco com ação mais rápida, enquanto a segunda fase de liberação sustentada fornece o fármaco por um período maior, aumentando os intervalos de aplicação e reduzindo a toxicidade (JOSHI; PATRAVALE, 2008; LU; HUANG; CHEN; YE *et al.*, 2019).

Os dados das análises *in vitro* referente ao NLC _{α} mostraram que o encapsulamento aumenta a citotoxicidade do α -tocoferol. Corroborando com esses dados, um trabalho foi publicado mostrando que NLCs com 10% de α -tocoferol diluídas até 200 vezes apresentam forte toxicidade em células HaCat, valor este que corresponde a formulação de 0,05% de α -tocoferol enquanto a menor concentração utilizada para o nosso teste corresponde a aproximadamente 0,0625% deste composto (MA; WANG; LIN; LUO *et al.*, 2007).

Os ensaios desenvolvidos por Cortesi *et al.* também mostraram que o α -tocoferol em NLC tem um maior potencial para reduzir a viabilidade celular de maneira dose dependente em relação à sua forma livre (CORTESI; VALACCHI; MURESAN; DRECHSLER *et al.*, 2017). Uma citotoxicidade dose dependente também foi relatada em ensaios com células HaCat após 24 horas de incubação com nanoemulsões e NLCs contendo α -tocoferol (VAZ; SILVA; AMARAL; MARTINS *et al.*, 2019). Outro estudo desenvolvido para avaliar o efeito de SLNs contendo α -tocoferol e dexorubicina em células cancerígenas mostrou que a incorporação do α -tocoferol aumentou

significativamente a citotoxicidade (OLIVEIRA; ARYASOMAYAJULA; PATTNI; MUSSI *et al.*, 2016).

Curiosamente, quando o α -tocoferol é encapsulado juntamente com o VB essa citotoxicidade é reduzida e as células HaCat mantem uma viabilidade de 74,27 e 70,96%, considerando os testes realizados com 24 e 72 horas de estímulo, respectivamente para a concentração de 3 mM de α -tocoferol na formulação. Vale destacar também que o *co-delivery* quando comparado ao NLC_{controle} apresentou menor citotoxicidade. Por isso, os dados sugerem que a encapsulação conjunta do VB é capaz de inibir os efeitos citotóxicos do α -tocoferol.

Os NLCs foram diretamente reticulados em colágeno e goma xantana para utilização tópica. Após a incorporação dos NLCs no hidrogel, compreender as propriedades reológicas das formulações é essencial, pois a viscosidade do gel influencia no seu espalhamento. Dessa maneira, essas análises permitem compreender a aderência da formulação à superfície da pele e a influência na taxa de liberação do fármaco (GHICA; HÎRJĂU; LUPULEASA; DINU-PÎRVU, 2016; GOYAL; GARG; MALIK; CHAUHAN *et al.*, 2015; LIM, 2017).

Os resultados de reologia mostraram que os hidrogéis desenvolvidos exibiram um comportamento de afinamento por cisalhamento, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Este comportamento não-newtoniano apresentado pelas formulações é compatível e desejado para fornecer um fluxo lento do fármaco e fácil distribuição na pele (ISLAM; RODRÍGUEZ-HORNEDO; CIOTTI; ACKERMANN, 2004). Comportamentos semelhantes também foram identificados em géis desenvolvidos para aplicação tópica de VB encapsulado ou não (MOHAMED; KASSEM; KHALIL; YOUNIS *et al.*, 2021; SENYIĞIT; TEKMEZ; SÖNMEZ; SANTI *et al.*, 2011)

Os hidrogéis contendo as NLCs foram avaliados em modelo experimental de DA induzido por DNCB. Os haptenos, como o DNCB, são pequenas moléculas que se ligam a proteínas, provocando uma resposta imune que são amplamente utilizados em modelos experimentais, uma vez que a exposição prolongada induz primeiramente a uma resposta imune de perfil Th1 e, mais tardiamente, uma resposta inflamatória crônica dominada por Th2 que é semelhante à DA humana. De fato, especialmente pacientes do sexo feminino, apresentam lesões cutâneas induzidas pela exposição crônica a haptenos presentes em bijuterias e perfumes (GILHAR; REICH; KEREN; KABASHIMA *et al.*, 2021).

Atualmente, os tratamentos tópicos são os mais utilizados no tratamento da DA leve a moderada, pois além de reduzir a inflamação, aliviar o prurido, restaurar a integridade epitelial e prevenir as recidivas das lesões, apresentam risco reduzido aos efeitos adversos (LUGER; AMAGAI; DRENO; DAGNELIE *et al.*, 2021). Neste contexto, a avaliação visual das lesões de pele, espessura da epiderme e aspectos clínicos da doença por um profissional capacitado, fornece informações importantes sobre o tratamento no desenvolvimento de novos produtos (JUNG; CHO; JUN; KOO *et al.*, 2011).

O espessamento da epiderme pode ser considerada uma das características gerais da DA (AKDIS; AKDIS; BIEBER; BINDSLEV-JENSEN *et al.*, 2006; LEUNG, D. Y.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I. *et al.*, 2004). As análises de espessura da orelha mostraram que a sensibilização e os desafios com DNCB foram eficientes em induzir o espessamento do epitélio no modelo de DA proposto neste trabalho. Os grupos de animais tratados com Hidrogel, NLC_{controle} e NLC_α também exibiram um aumento do espessamento epidérmico, enquanto os grupos de animais que após a sensibilização, foram desafiados e receberam concomitantemente o tratamento tópico com os hidrogéis de NLC_{VB}, NLC_{VBα} e VB_{comercial} reduziram significativamente a espessura da orelha.

Corroborando com nossos dados, um estudo desenvolvido por Lehto *et al.* demonstrou que o tratamento tópico com VB reduz significativamente não somente a espessura epitelial, como também diminui o infiltrado de células inflamatórias como eosinófilos, mastócitos e células CD11c⁺ e macrófagos em modelos induzidos com ovalbumina (OVA) (LEHTO; SAVINKO; WOLFF; KVIST *et al.*, 2010).

A avaliação do *score* de DA, mostrou que animais não receberam nenhum tipo de tratamento (descrito neste estudo como grupo DNCB), como esperado, apresentaram altas pontuações para eritema/hemorragia, edemas, escoriação/erosão, secura/descamação nas orelhas, demonstrando um quadro grave de DA (LEUNG; HIRSCH; SCHNEIDER; MOODY *et al.*, 1990; YU; WANG; WAN; ZHAI *et al.*, 2018).

Os animais tratados com NLC_{VB}, NLC_{VBα} e VB_{comercial}, no 16º dia experimental, que corresponde ao 3º dia de tratamento com apenas uma aplicação tópica, já demonstraram melhora significativa de todos os parâmetros clínicos avaliados. Esses dados sugerem que o tratamento com as formulações, mesmo que por um curto período, é suficiente para proporcionar uma melhora dos sintomas da DA. Além disso, o

tratamento com essas formulações demonstrou um papel importante na manutenção da integridade da barreira epitelial, reduzindo a secura/descamação e a escoriação/erosão da pele.

Embora alguns estudos demonstrem que o tratamento tópico com VB induz apoptose, diminui a proliferação de células epidérmicas e dérmicas e concentração de colágeno epitelial (DAJEE; MUCHAMUEL; SCHRYVER; OO *et al.*, 2006; KIKUCHI; TAGAMI, 2002; MEINDL; VACULIK; MEINGASSNER; KRAMER *et al.*, 2009), notamos que o tratamento com as nossas formulações os animais restauraram completamente a função de barreira epitelial que foi comprometida pela inflamação. Nesse sentido, acreditamos que o colágeno e a xantana incorporados na formulação, em ação conjunta com o VB contribuíram para a cicatrização das lesões e restauração da barreira epitelial, reduzindo as deficiências apresentadas pelos tratamentos propostos nos estudos anteriores.

Praça *et al.* desenvolveram uma microemulsão com 0,1% de α -tocoferol para aplicação tópica e demonstraram baixo *score* de inflamação epitelial nos intervalos de 2, 4 e 24 horas após aplicação tópica da microemulsão com α -tocoferol em modelo de inflamação induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), sugerindo um tratamento de inflamação aguda de pele (PRAÇA; VIEGAS; PEH; GARBIN *et al.*, 2020).

Surpreendentemente, nosso estudo mostrou que animais tratados com a formulação com NLC α , apresentaram *score* de DA elevado já no 3º dia de tratamento. No último dia experimental, os animais tratados com NLC α apresentaram eritema e edema semelhantes ao grupo DNCB e altas pontuações para escoriação/erosão e secura/descamação, sugerindo um potencial inflamatório em tratamentos a longo prazo e em concentrações maiores de α -tocoferol.

Para melhor entender os efeitos das formulações no modelo experimental de DA, as lesões cutâneas foram avaliadas quanto as alterações histopatológicas e infiltrado de mastócitos. Complementando os dados de parâmetros clínicos dos animais, as análises histológicas revelaram uma epiderme espessa, devido a hipertrofia e hiperqueratose dos queratinócitos epidérmicos e um intenso infiltrado de células inflamatórias, nos grupos DNCB, Hidrogel, NLC_{controle} e NLC α quando comparados ao grupo controle que não recebeu nenhum tipo de manipulação.

A presença de células inflamatórias na pele provoca um aumento da espessura epitelial nas lesões de pele na DA (LEUNG, 2000; MATSUI; NISHIKAWA, 2005;

SIMON; BRAATHEN; SIMON, 2004). Os camundongos tratados com NLC_{VB} , $NLC_{VB\alpha}$ e $VB_{comercial}$, mostraram uma epiderme de espessura semelhante aos animais controle e redução significativa de células inflamatórias nas lesões epiteliais. Corroborando com esses dados, Noguchi et al. mostrou que o tratamento tópico com VB reduz significativamente o infiltrado de células T CD4⁺ e eosinófilos em lesões de DA (NOGUCHI; TOMINAGA; TAKAHASHI; MATSUDA *et al.*, 2017).

Outro estudo desenvolvido por Dajee et al., em modelo de DA induzido por ácaros da poeira domiciliar, uma importante fonte de alérgenos, mostrou que o tratamento com VB mostrou redução do inchaço da orelha, da hiperplasia epidérmica e infiltrado celular, do número de mastócitos, eosinófilos e células T CD4⁺ no tecido lesionado (DAJEE; MUCHAMUEL; SCHRYVER; OO *et al.*, 2006).

Alguns estudos sugerem a participação dos mastócitos na patogênese da DA, especialmente pelo aumento do número dessas células em lesões de DA (EROĞLU; AZIZOĞLU; ÖZYAZIÇI; NENNI *et al.*, 2016; KAWAKAMI; ANDO; KIMURA; WILSON *et al.*, 2009; YU; WANG; WAN; ZHAI *et al.*, 2018). A coloração diferencial para mastócitos evidenciou um aumento do infiltrado de mastócitos no grupo DNCB e nos animais tratados com Hidrogel, $NLC_{controle}$ e NLC_{α} enquanto o tratamento com as formulações tópicos contendo NLC_{VB} , $NLC_{VB\alpha}$ e $VB_{comercial}$ reduziram eficazmente o número dessas células nas lesões.

Corroborando com nossos dados, o estudo desenvolvido por Eroğlu em modelo experimental de DA induzido por dinitrofluorobenzeno (DNFB) mostrou que o tratamento tópico com lipossomos contendo VB, reduziu em 50% os mastócitos infiltrados em tecido epitelial (EROĞLU; AZIZOĞLU; ÖZYAZIÇI; NENNI *et al.*, 2016). Os mastócitos atuam como as principais células efetoras na hipersensibilidade imediata, expressam em sua superfície o receptor de alta afinidade para IgE. Uma vez que a IgE se liga a esse receptor, os mastócitos se rompem, liberando vários mediadores inflamatórios (KAWAKAMI; ANDO; KIMURA; WILSON *et al.*, 2009).

A DA é uma doença de pele essencialmente mediada por IgE e, o aumento de IgE total é observado nos modelos experimentais de lesões semelhantes à DA utilizando camundongos BALB/c induzidos por DNCB (CHAN; LIOU; XU; SHEN *et al.*, 2013). Este é o primeiro trabalho que avalia a produção de IgE nos camundongos após tratamento tópico com VB e α -tocoferol encapsulado em NLC.

Lehto et al. demonstrou que o tratamento tópico com VB não exerce efeito sobre a produção de IgE sérica em modelo experimental de DA induzido por OVA (LEHTO; SAVINKO; WOLFF; KVIST *et al.*, 2010). De modo similar, nossos dados também não demonstraram diferenças significativas na concentração sérica de IgE. No entanto, observamos que localmente o DNCB estimula a produção de IgE e que a mesma pode ser inibida com a utilização tópica das formulações NLC_{VB} e VB_{comercial}.

Diferentemente dos resultados de VB, observamos que o tratamento tópico com DNCB, Hidrogel, NLC_{controle}, NLC α e NLC_{VB α} não reduziram significativamente a produção de IgE no homogenato de tecido da orelha. IgE. Hayashi et al. também demonstrou em seu trabalho, que os animais que receberam injeção epitelial de α -tocoferol aumentaram a produção de IgE quando comparado ao grupo não tratado (HAYASHI; SUGAYA; OHKOSHI; SEKIZAWA *et al.*, 2012).

Nas lesões de DA, os receptores de IgE são regulados positivamente nas células de Langerhans e, após a ligação, estimulam a produção de TNF α e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), que pode ser bloqueada por inibidores da ativação de NF- κ B (KRAFT; NOVAK; KATOH; BIEBER *et al.*, 2002; NOVAK; BIEBER; KRAFT, 2004). Dessa maneira, de modo geral, as lesões da DA são provocadas pelo aumento da produção local de várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (LEUNG, 1997; LEUNG; GEHA, 1983).

Os animais foram avaliados quanto a produção de citocinas presentes na resposta imune de células Th1, Th2 e Th17. As citocinas do tipo Th2/Th17 são importantes na fase aguda da DA, enquanto a inflamação do tipo Th2/Th1 são secretadas na fase crônica da DA (AKDIS; AKDIS; BIEBER; BINDSLEV-JENSEN *et al.*, 2006; CESARE; MEGLIO; NESTLE, 2008; LEUNG, D. Y. M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I. *et al.*, 2004).

Nossos dados demonstram que o modelo de DA induzido por DNCB, estimula uma resposta Th1 e Th2, com a produção de IFN γ , TNF α , IL-6 e IL-4, mas não de IL-2, IL-17A e IL-10, sugerindo que o modelo experimental desenvolvido caracterizava uma inflamação crônica. Confirmando o papel anti-inflamatório das formulações NLC_{VB}, NLC_{VB α} e VB_{comercial}, mostramos que o tratamento tópico com reduz eficazmente a liberação das citocinas produzidas na inflamação epitelial provocada pela aplicação tópica de DNCB.

Dados semelhantes foram alcançados por Dajee et al., mostrando que o tratamento com VB é capaz de inibir citocinas de perfil Th1 e Th2, tais como, IL-4, IL-13, IFN γ , IL-1 β e TNF α em modelo de DA induzido por ácaros de poeira (DAJEE; MUCHAMUEL; SCHRYVER; OO *et al.*, 2006). Adicionalmente, o trabalho de Lehto et al. também demonstrou que uma redução significativa da produção de IL-4, IL-13 e IFN γ em animais tratados com VB (LEHTO; SAVINKO; WOLFF; KVIST *et al.*, 2010).

Outro estudo utilizando células dendríticas semelhantes a LC geradas a partir de camundongos estimulados com OVA, mostrou que o tratamento com betametasona inibe as respostas de células Th1 e Th2, através da regulação negativa da produção IFN γ e IL-4, respectivamente. Esse estudo sugere que o mecanismo de ação do VB envolveria a inibição da orquestração das LCs na polarização de células T, inibindo as respostas Th1 e Th2 e controlando a inflamação provocada na DA (MATSUI; TAMAI; IKEDA, 2016).

O TNF α é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por queratinócitos e macrófagos durante lesão cutânea, infecção e inflamação (BANNO; GAZEL; BLUMENBERG, 2004). Essa citocina que participa não somente das respostas imunes mas apresenta uma função importante na apoptose, promove a diferenciação de monócitos/macrófagos, pode aumentar a proliferação de células B ativadas e ser um potente indutor de IL-6 (SEDDER; MCDERMOTT, 2014).

A IL-6 está associada à destruição de células e membranas no local da lesão sendo, portanto, identificada como um sinal químico para a infiltração de outras células anti-inflamatórias (GABAY, 2006). Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, ou seja, TNF α e IL-6, elevam a infiltração de macrófagos e basófilos na camada da derme (ZELECHOWSKA; AGIER; KOZŁOWSKA; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, 2018).

Neste trabalho, demonstramos que no *co-delivery*, o VB foi importante também para a inibir a inflamação provocada pelo carreamento conjunto do α -tocoferol, inibindo eficazmente o aumento da espessura epidérmica, o ressecamento epitelial, infiltrado de mastócitos na lesão e secreção de IFN γ , TNF α , IL-6 e IL-4, mas não da produção de IgE tecidual.

Dessa maneira, tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a utilização de NLCs para o carreamento de VB seja uma boa estratégia para o tratamento mais eficaz da DA. Aqui demonstramos que além da redução significativa da citotoxicidade apresentada pela forma livre do fármaco, observamos o potencial anti-inflamatório de NLC_{VB} já nos primeiros dias de uso tópico, confirmados pela análise dos parâmetros

clínicos, histopatológicos e imunológicos do modelo murino. Os resultados apresentados nos possibilitam conjecturar a possibilidade da redução de dose do fármaco no nanocarreamento, ainda mantendo a eficácia terapêutica.

Além do potencial uso para tratamento da DA, vários aspectos indicam o pioneirismo deste estudo: a metodologia de produção dos NLCs, a utilização técnica de análise de rastreamento de nanopartículas que permite determinar o rendimento e a concentração dos NLCs produzidos, o uso do colágeno na reticulação do hidrogel para incorporação do NLC contendo o valerato de betametasona e, por ser primeiro trabalho que avalia a resposta imune dos animais tratados com o hidrogel de NLCs encapsulando VB.

Animais tratados com NLC α apresentaram uma redução significativa de TNF α local da inflamação. Um estudo publicado sugere que a vitamina E inibe indiretamente a expressão de TNF α pelo *downregulation* da enzima lipoxigenase 5 que diminui a ativação de NF-kB, resultando na diminuição da síntese e secreção de TNF α de monócitos (DEVARAJ; JIALAL, 2005). No entanto, identificamos níveis de IL-4, IFN γ e IL-6 semelhantes aos encontrados nos animais que não receberam nenhum tipo de tratamento, sugerindo uma reação inflamatória intensa com a aplicação tópica de NLC α .

Notavelmente existe uma escassez de estudos que avaliem o papel da aplicação tópica de α -tocoferol para o tratamento de doenças dermatológicas, especialmente da DA (MOHD ZAFFARIN; NG; NG; HASSAN *et al.*, 2020; TEO; TAY; TEY; UNG *et al.*, 2021). A vitamina E é utilizada há vários anos na dermatologia experimental e clínica. No entanto, ainda faltam estudos clínicos controlados que forneçam uma justificativa para dosagens e indicações clínicas bem definidas (TEO; TAY; TEY; UNG *et al.*, 2021; THIELE; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, 2007).

Ainda que os estudos celulares disponíveis demonstrem que a vitamina E pareça ser promissora como tratamento para a DA, reduzindo o estresse oxidativo (GEHIN; GUYON; NICOD, 2006; MASAKI; OKANO; OCHIAI; OBAYASHI *et al.*, 2002) e a perda de água epitelial, melhorando a retenção de água (GEHIN; GUYON; NICOD, 2006) e regulando a expressão gênica de marcadores de diferenciação de queratinócitos (DE PASCALE; BASSI; PATRONE; VILLACORTA *et al.*, 2006), estudos que demonstrem uma análise imunopatológica do α -tocoferol ainda não tinha sido relatados.

Os estudos atualmente disponíveis na literatura, conduzidos em animais e humanos realizam a aplicação do α -tocoferol por injeção epitelial (HAYASHI;

SUGAYA; OHKOSHI; SEKIZAWA *et al.*, 2012) ou suplementação oral para o tratamento de lesões de DA (JAFFARY; FAGHIHI; MOKHTARIAN; HOSSEINI, 2015; JAVANBAKHT; KESHAVARZ; DJALALI; SIASSI *et al.*, 2011; PATRIZI; RAONE; NERI; GURIOLI *et al.*, 2016; TSOURELI-NIKITA; HERCOGOVA; LOTTI; MENCHINI, 2002). Este trabalho trata-se, portanto, do primeiro estudo descrito na literatura relatando o encapsulamento de α -tocoferol em NLC para aplicação tópica no tratamento da DA.

Os dados aqui apresentados demonstram que a utilização de nanocarreadores para aplicação tópica do α -tocoferol apresentaram ressecamento epitelial, inflamação caracterizada por espessamento epidérmico provocado pelo aumento do infiltrado de células inflamatórias, com aumento significativo da quantidade de mastócitos no local da lesão e aumento da produção local de IgE, IL-4, IFN γ e IL-6.

Um estudo demonstrou que a concentração de α -tocoferol pode aumentar 10,6 vezes quando é aplicado topicamente em relação a administração oral. É importante mencionar também que a aplicação tópica forma um reservatório no interior da pele, permanecendo na pele por vários dias após a aplicação (KAUR; KAPILA; AGRAWAL, 2007), que pode ser potencializado com a utilização de nanocarreadores para a veiculação.

Diante disso, acreditamos que o nanocarreador desenvolvido neste estudo para a veiculação do α -tocoferol tenha aumentado consideravelmente a absorção da vitamina, no entanto, outros estudos ainda precisam ser realizados para averiguação dessa hipótese. Por isso, com os recentes avanços da nanotecnologia e o surgimento de novos produtos farmacêuticos, destacamos aqui a importância dos ensaios imunopatológicos especialmente para a regulamentação de produtos tópicos, de modo a garantir a segurança de uso (SONI; KUKEREJA; KAPUR; KOHLI, 2015).

O uso tópico de vitamina E já foi relatado estar relacionado ao desenvolvimento de um quadro de dermatite alérgica de contato (DAC) em pacientes com DA. Os pacientes apresentaram eritema, pápulas urticariformes e dermatite papulovesicular em diferentes partes do corpo e não relataram recorrência de sintomas alérgicos após a descontinuação do creme (DE GROOT; BERRETTY; VAN GINKEL; DEN HENGST *et al.*, 1991).

A vitamina E presente na dieta também foi relatada como causa da DCA recentemente. Um paciente com DA de longa data que não melhora com terapia tópica, apresentou melhora da DA generalizada retirando a vitamina E da dieta e produtos tópicos

e, com a reintrodução houve novamente a ativação da DA (CHEN; RAFFI; MURASE, 2020). Embora os casos de DAC se apresentem esporadicamente, estudos mais aprofundados que avaliem o papel da aplicação tópica do α -tocoferol na DA, ainda precisam ser realizados.

7. Conclusão

CONCLUSÃO

Observações obtidas por meio das abordagens metodológicas realizadas neste trabalho permitem concluir que:

- Foi possível desenvolver nanocarreadores lipídicos para a veiculação de valerato de betametasona e/ou α -tocoferol com potencial zeta diferente de zero, baixo índice de polidispersão, alto rendimento, pH compatível com a pele e alta eficiência de encapsulamento;
- As formulações $NLC_{controle}$, NLC_{α} e NLC_{VB} apresentam boa estabilidade até 12 meses e $NLC_{VB\alpha}$ até 8 meses;
- Nanocarreadores contendo VB e α -tocoferol apresentam formato esférico e com distribuição de tamanhos monodispersos;
- A citotoxicidade do VB é reduzida após o encapsulamento e aumentada na incorporação do α -tocoferol em NLC;
- A incorporação dos NLCs em hidrogel apresenta viscosidade compatível com aplicação tópica;
- O modelo experimental de DA induzido por DNCB apresenta um quadro de inflamação crônica;
- O tratamento com a aplicação tópica dos hidrogéis contendo NLC_{VB} melhoram os sinais clínicos de DA, reduzindo o infiltrado inflamatório epitelial e a contagem de mastócitos na lesão, a produção de IgE tecidual e das citocinas $IFN\gamma$, IL-4, IL-6 e $TNF\alpha$ em modelo experimental.
- O tratamento com $NLC_{VB\alpha}$ induz um perfil semelhante ao NLC_{VB} , exceto com relação a redução da produção de IgE local;
- O tratamento com NLC_{α} não reduz o processo inflamatório epitelial, apresentando altas pontuações no *score* de DA, espessamento da epiderme, lesões ressecadas, com intenso infiltrado inflamatório, aumento significativo da contagem de mastócitos, IgE e das citocinas $IFN\gamma$, IL-4, IL-6 e $TNF\alpha$ nas lesões de pele semelhantes a DA.

Referências

REFERÊNCIAS

ABLA, M. J.; BANGA, A. K. Formulation of tocopherol nanocarriers and in vitro delivery into human skin. **International Journal Cosmetic Science**, v.36, n. 3, p. 239-246, 2014.

ADDOR, F. A.; TAKAOKA, R.; RIVITTI, E. A.; AOKI, V. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. **Internacional Journal Dermatology**, v.51, n. 6, p. 672-676, 2012.

AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; PRASAD, S.; KANNAPPAN, R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. **Biochemical Pharmacology**, v.80, n. 11, p. 1613-1631, 2010.

AGRAWAL, R.; WISNIEWSKI, J. A.; WOODFOLK, J. A. The role of regulatory T cells in atopic dermatitis. **Current problems in dermatology**, v.41, p. 112-124, 2011.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M.; BIEBER, T.; BINDSLEV-JENSEN, C. *et al.* Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.118, n. 1, p. 152-169, 2006.

AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.116, n. 5, p. 961-968; quiz 969, 2005.

ALEXANDER, T.; MAXIM, E.; CARDWELL, L. A.; CHAWLA, A. *et al.* Prescriptions for atopic dermatitis: oral corticosteroids remain commonplace. **Journal Dermatology Treatment**, v.29, n. 3, p. 238-240, 2018.

ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. **American Journal Physiology**, v.269, n. 4 Pt 1, p. G467-475, 1995.

ANDO, T.; MATSUMOTO, K.; NAMIRANIAN, S.; YAMASHITA, H. *et al.* Mast cells are required for full expression of allergen/SEB-induced skin inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133, n. 12, p. 2695-2705, 2013.

ANTOINE, E. E.; VLACHOS, P. P.; RYLANDER, M. N. Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v.20, n. 6, p. 683-696, 2014.

- ATTAMA, A.; MOMOH, M.; BUILDERS, P. Lipid nanoparticulate drug delivery systems: A revolution in dosage form design and development. **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**, p. 107-140, 2012.
- AVENA-WOODS, C. Overview of atopic dermatitis. **American Journal Manage Care**, v.23, n. 8 Suppl, p. S115-s123, 2017.
- BANNO, T.; GAZEL, A.; BLUMENBERG, M. Effects of tumor necrosis factor- α (TNF α) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, n. 31, p. 32633-32642, 2004.
- BARBAROT, S.; AUZIERE, S.; GADKARI, A.; GIROLOMONI, G. *et al.* Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. **Allergy**, v.73, n. 6, p. 1284-1293, 2018.
- BARNES, L.; KAYA, G.; ROLLASON, V. Topical corticosteroid-induced skin atrophy: a comprehensive review. **Drug Safety**, v.38, n. 5, p. 493-509, 2015.
- BASHIRI, S.; GHANBARZADEH, B.; AYASEH, A.; DEHGHANNYA, J. *et al.* Preparation and characterization of chitosan-coated nanostructured lipid carriers (CH-NLC) containing cinnamon essential oil for enriching milk and anti-oxidant activity, **LWT**, v.119, p. 108836, 2020.
- BATISTA, D. I.; PEREZ, L.; ORFALI, R. L.; ZANIBONI, M. C. *et al.* Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. **Journal European Academy Dermatology Venereology**, v.29, n. 6, p. 1091-1095, 2015.
- BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.9, n. 5, p. 497-508, 2012.
- BAUTISTA, D. M.; WILSON, S. R.; HOON, M. A. Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. **Nature Neuroscience**, v.17, n. 2, p. 175-182, 2014.
- BERKE, R.; SINGH, A.; GURALNICK, M. Atopic dermatitis: an overview. **American Family Physician**, v.86, n. 1, p. 35-42, 2012.
- BHATTACHARJEE, S. J. J. o. c. r. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? **Journal Control Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.
- BIEBER, T. Atopic dermatitis. **New England Journal of Medicine**, v.358, n. 14, p. 1483-1494, 2008.

BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Annals Dermatology**, v.22, n. 2, p. 125-137, 2010.

BOMBALDI DE SOUZA, R. F.; BOMBALDI DE SOUZA, F. C.; THORPE, A.; MANTOVANI, D. *et al.* Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering. **International Journal Biological Macromolecules**, v.143, p. 619-632, 2020.

BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNUNG, J. *et al.* Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **Journal Cell Biology**, v.106, n. 3, p. 761-771, 1988.

BRANDT, E. B.; SIVAPRASAD, U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. **Journal of clinical & cellular immunology**, v.2, n. 3, p. 110, 2011.

BRODELL, L. A.; ROSENTHAL, K. S. Skin Structure and Function: The Body's Primary Defense Against Infection. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v.16, n. 2, 2008.

BROWN, S. J.; IRVINE, A. D. Atopic eczema and the filaggrin story. **Seminars Cutaneous Medicine Surgery**, v.27, n. 2, p. 128-137, 2008.

BUMMER, P. M. Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery--solid lipid nanoparticles. **Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.21, n. 1, p. 1-20, 2004.

CABANILLAS, B.; BREHLER, A.-C.; NOVAK, N. Atopic dermatitis phenotypes and the need for personalized medicine. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v.17, n. 4, p. 309-315, 2017.

CAPRONI, M.; ANTIGA, E.; TORCHIA, D.; VOLPI, W. *et al.* FoxP3-expressing T regulatory cells in atopic dermatitis lesions. **Allergy Asthma Proc**, v.28, n. 5, p. 525-528, 2007.

CAREY, S. P.; KRANING-RUSH, C. M.; WILLIAMS, R. M.; REINHART-KING, C. A. Biophysical control of invasive tumor cell behavior by extracellular matrix microarchitecture. **Biomaterials**, v.33, n. 16, p. 4157-4165, 2012.

CARLOS, G.; URIBE, P.; FERNÁNDEZ-PEÑAS, P. Rational use of topical corticosteroids. **Australian Prescriber**, p. 157, 2013.

CESARE, A. D.; MEGLIO, P. D.; NESTLE, F. O. A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? **Journal Investive Dermatology**, v.128, n. 11, p. 2569-2571, 2008.

CEVIKBAS, F.; WANG, X.; AKIYAMA, T.; KEMPKES, C. *et al.* A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.133, n. 2, p. 448-460, 2014.

CHAN, C. C.; LIOU, C. J.; XU, P. Y.; SHEN, J. J. *et al.* Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. **Journal Dermatology Science**, v.72, n. 2, p. 149-157, 2013.

CHAUHAN, I.; YASIR, M.; VERMA, M.; SINGH, A. P. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v.10, n. 2, p. 150-165, 2020.

CHAUHAN, I.; YASIR, M.; VERMA, M.; SINGH, A. P. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.10, n. 2, p. 150-165, 2020.

CHEN, J. L.; NIU, X. L.; GAO, Y. L.; MA, L. *et al.* IL-18 knockout alleviates atopic dermatitis-like skin lesions induced by MC903 in a mouse model. **International Journal Molecular Medicine**, v.46, n. 2, p. 880-888, 2020.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **Journal American Academy Dermatology**, v.67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

CHEN, R.; RAFFI, J.; MURASE, J. E. Tocopherol Allergic Dermatitis Masquerading as Lifelong Atopic Dermatitis. **Dermatitis**, v.31, n. 1, p. e3-e4, 2020.

CHIEOSILAPATHAM, P.; KIATSURAYANON, C.; UMEHARA, Y.; TRUJILLO-PAEZ, J. V. *et al.* Keratinocytes: innate immune cells in atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.204, n. 3, p. 296-309, 2021.

CHIVERS, P. R. A.; SMITH, D. K. Spatially-resolved soft materials for controlled release – hybrid hydrogels combining a robust photo-activated polymer gel with an interactive supramolecular gel. **Chemical Science**, v.8, n. 10, p. 7218-7227, 2017.

CHORRO, L.; SARDE, A.; LI, M.; WOOLLARD, K. J. *et al.* Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. **Journal Experimental Medicine**, 206, n. 13, p. 3089-3100, 2009.

CLÁUDIA PAIVA-SANTOS, A.; GAMA, M.; PEIXOTO, D.; SOUSA-OLIVEIRA, I. *et al.* Nanocarrier-based dermopharmaceutical formulations for the topical management of atopic dermatitis. **International Journal of Pharmaceutics**, 618, p. 121656, 2022.

- COLE, C.; KROBOTH, K.; SCHURCH, N. J.; SANDILANDS, A. *et al.* Filaggrin-stratified transcriptomic analysis of pediatric skin identifies mechanistic pathways in patients with atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, 134, n. 1, p. 82-91, 2014.
- CORK, M. J.; DANBY, S. G.; VASILOPOULOS, Y.; HADGRAFT, J. *et al.* Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. **Journal Investigative Dermatology**, v.129, n. 8, p. 1892-1908, 2009.
- CORTESI, R.; VALACCHI, G.; MURESAN, X. M.; DRECHSLER, M. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC) for the delivery of natural molecules with antimicrobial activity: production, characterisation and in vitro studies. **Journal Microencapsulation**, v.34, n. 1, p. 63-72, 2017.
- CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v.71, n. 1, p. 156-166, 2019.
- CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v.71, n. 1, p. 156-166, 2019.
- CZARNOWICKI, T.; ESAKI, H.; GONZALEZ, J.; MALAJIAN, D. *et al.* Early pediatric atopic dermatitis shows only a cutaneous lymphocyte antigen (CLA)(+) TH2/TH1 cell imbalance, whereas adults acquire CLA(+) TH22/TC22 cell subsets. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.136, n. 4, p. 941-951.e943, 2015.
- DAINICHI, T.; KITO, A.; OTSUKA, A.; NAKAJIMA, S. *et al.* The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. **Nature Immunology**, v.19, n. 12, p. 1286-1298, 2018.
- DAJEE, M.; MUCHAMUEL, T.; SCHRYVER, B.; OO, A. *et al.* Blockade of experimental atopic dermatitis via topical NF-kappaB decoy oligonucleotide. **Journal Investigative Dermatology**, v.126, n. 8, p. 1792-1803, 2006.
- DANSO, M. O.; VAN DRONGELEN, V.; MULDER, A.; VAN ESCH, J. *et al.* TNF- α and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. **Journal Investive Dermatology**, v.134, n. 7, p. 1941-1950, 2014.
- DE BENEDETTO, A.; RAFAELS, N. M.; MCGIRT, L. Y.; IVANOV, A. I. *et al.* Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.127, n. 3, p. 773-786.e771-777, 2011.

DE GROOT, A. C.; BERRETTY, P. J.; VAN GINKEL, C. J.; DEN HENGST, C. W. *et al.* Allergic contact dermatitis from tocopheryl acetate in cosmetic creams. **Contact Dermatitis**, v.25, n. 5, p. 302-304, 1991.

DE MOURA, L. D.; RIBEIRO, L. N. M.; DE CARVALHO, F. V.; RODRIGUES DA SILVA, G. H. *et al.* Docetaxel and Lidocaine Co-Loaded (NLC-in-Hydrogel) Hybrid System Designed for the Treatment of Melanoma. **Pharmaceutics**, v.13, n. 10, p. 1552, 2021a.

DE PASCALE, M. C.; BASSI, A. M.; PATRONE, V.; VILLACORTA, L. *et al.* Increased expression of transglutaminase-1 and PPARgamma after vitamin E treatment in human keratinocytes. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.447, n. 2, p. 97-106, 2006.

DEL ROSSO, J.; FRIEDLANDER, S. F. Corticosteroids: Options in the era of steroid-sparing therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.53, n. 1, Supplement, p. S50-S58, 2005.

DENKER, B. M.; NIGAM, S. K. Molecular structure and assembly of the tight junction. **American Journal Physiology**, v.274, n. 1 Pt 2, p. F1-9, 1998.

DEVARAJ, S.; JIALAL, I. α -Tocopherol decreases tumor necrosis factor- α mRNA and protein from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. **Free Radical Biology and Medicine**, 38, n. 9, p. 1212-1220, 2005.

DOANE, T. L.; CHUANG, C.-H.; HILL, R. J.; BURDA, C. J. A. o. c. r. Nanoparticle ζ -potentials. **American Chemical Society**, v.45, n. 3, p. 317-326, 2012.

DOKTOROVOVÁ, S.; KOVAČEVIĆ, A. B.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v.108, p. 235-252, 2016.

DOKTOROVOVA, S.; SHEGOKAR, R.; SOUTO, E. Role of excipients in formulation development and biocompatibility of lipid nanoparticles (SLNs/NLCs) In: Ficaí D, Grumezescu AM, editors. Nanostructures for novel therapy. : Amsterdam: Elsevier 2017.

EGAWA, G.; KABASHIMA, K. Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. **Journal Invesgative Dermatology**, v.131, n. 11, p. 2178-2185, 2011.

REFERÊNCIAS

EICHENFIELD, L. F.; TOM, W. L.; BERGER, T. G.; KROL, A. *et al.* Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. **Journal American Academy Dermatology**, v.71, n. 1, p. 116-132, 2014.

ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. **Seminars Dermatology**, v.11, n. 2, p. 176-182, 1992.

ELIAS, P. M.; HATANO, Y.; WILLIAMS, M. L. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.121, n. 6, p. 1337-1343, 2008.

ELIAS, P. M.; WAKEFIELD, J. S. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.134, n. 4, p. 781-791.e781, 2014.

ELIZALDE-PEÑA, E. A.; ZARATE-TRIVIÑO, D. G.; NUÑO-DONLUCAS, S. M.; MEDINA-TORRES, L. *et al.* Synthesis and characterization of a hybrid (chitosan-glycidyl methacrylate)-xanthan hydrogel. **Journal Biomaterials Science Polymer Edition**, v.24, n. 12, p. 1426-1442, 2013.

EROĞLU, İ.; AZIZOĞLU, E.; ÖZYAZICI, M.; NENNI, M. *et al.* Effective topical delivery systems for corticosteroids: dermatological and histological evaluations. **Drug Delivery**, v.23, n. 5, p. 1502-1513, 2016.

EVANS, H. M.; BISHOP, K. S. ON THE EXISTENCE OF A HITHERTO UNRECOGNIZED DIETARY FACTOR ESSENTIAL FOR REPRODUCTION. **Science**, v.56, n. 1458, p. 650-651, 1922.

EYERICH, S.; EYERICH, K.; TRIDL-HOFFMANN, C.; BIEDERMANN, T. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. **Trends Immunology**, v.39, n. 4, p. 315-327, 2018.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. Junctional complexes in various epithelia. **Journal Cell Biology**, v.17, p. 375-412, 1963.

FERNHOLZ, E. On the Constitution of α -Tocopherol. **Journal of the American Chemical Society**, v.60, n. 3, p. 700-705, 1938.

FERREIRA, L. M.; SARI, M. H. M.; AZAMBUJA, J. H.; DA SILVEIRA, E. F. *et al.* Xanthan gum-based hydrogel containing nanocapsules for cutaneous diphenyl diselenide delivery in melanoma therapy. **Investigative New Drugs**, v.38, n. 3, p. 662-674, 2020.

REFERÊNCIAS

- FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v.27, n. 5, p. 796-810, 2010.
- FUJIMURA, T.; OKUYAMA, R.; ITO, Y.; AIBA, S. Profiles of Foxp3⁺ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. **British Journal Dermatology**, v.158, n. 6, p. 1256-1263, 2008.
- FUJITA, H.; SHEMER, A.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; JOHNSON-HUANG, L. M. *et al.* Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.128, n. 3, p. 574-582.e571-512, 2011.
- FURUE, M. Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis. **International Journal Molecular Science**, v.21, n. 15, 2020.
- FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A. *et al.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal Cell Biology**, v.123, n. 6 Pt 2, p. 1777-1788, Dec 1993.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research Therapy**, v.8 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S3, 2006.
- GALLEGOS-ALCALÁ, P.; JIMÉNEZ, M.; CERVANTES-GARCÍA, D.; SALINAS, E. The Keratinocyte as a Crucial Cell in the Predisposition, Onset, Progression, Therapy and Study of the Atopic Dermatitis. **International Journal Molecular Science**, v.22, n. 19, 2021.
- GANDHI, N. A.; BENNETT, B. L.; GRAHAM, N. M.; PIROZZI, G. *et al.* Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.15, n. 1, p. 35-50, 2016.
- GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v.6, p. 37-56, 2017.
- GAO, W.; VECCHIO, D.; LI, J.; ZHU, J. *et al.* Hydrogel containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery. **ACS Nano**, v.8, n. 3, p. 2900-2907, 2014.

REFERÊNCIAS

GAO, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, L. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. **Annals of biomedical engineering**, v.44, n. 6, p. 2049-2061, 2016.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. : Google Patents 1993.

GASPAR, R.; DUNCAN, R. Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, n. 13, p. 1220-1231, 2009.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v.22, n. 1, p. 27-34, 2006.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. **Research Pharmaceutical Sciences**, v.13, n. 4, p. 288-303, 2018.

GHICA, M. V.; HÎRJĂU, M.; LUPULEASA, D.; DINU-PÎRVU, C. E. Flow and Thixotropic Parameters for Rheological Characterization of Hydrogels. **Molecules**, v.21, n. 6, 2016.

GILABERTE, Y.; PRIETO-TORRES, L.; PASTUSHENKO, I.; JUARRANZ, Á. Chapter 1 - Anatomy and Function of the Skin. *In*: HAMBLIN, M. R.; AVCI, P., *et al* (Ed.). **Nanoscience in Dermatology**. Boston: Academic Press, 2016. p. 1-14.

GILHAR, A.; REICH, K.; KEREN, A.; KABASHIMA, K. *et al*. Mouse models of atopic dermatitis: a critical reappraisal. **Experimental Dermatology**, v.30, n. 3, p. 319-336, 2021.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v.133, p. 285-308, 2018.

GOYAL, G.; GARG, T.; MALIK, B.; CHAUHAN, G. *et al*. Development and characterization of niosomal gel for topical delivery of benzoyl peroxide. **Drug Delivery**, v.22, n. 8, p. 1027-1042, 2015.

GREWE, M.; CZECH, W.; MORITA, A.; WERFEL, T. *et al*. Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. **Journal Immunology**, v.161, n. 1, p. 415-420, 1998.

REFERÊNCIAS

GREWE, M.; WALTHER, S.; GYUFKO, K.; CZECH, W. *et al.* Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. **Journal Investigative Dermatologu**, v.105, n. 3, p. 407-410, 1995.

GROS, E.; BUSSMANN, C.; BIEBER, T.; FÖRSTER, I. *et al.* Expression of chemokines and chemokine receptors in lesional and nonlesional upper skin of patients with atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.124, n. 4, p. 753-760.e751, 2009.

GROS, E.; PETZOLD, S.; MAINTZ, L.; BIEBER, T. *et al.* Reduced IFN- γ receptor expression and attenuated IFN- γ response by dendritic cells in patients with atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.128, n. 5, p. 1015-1021, 2011.

GUICHARD, A.; HUMBERT, P.; TISSOT, M.; MURET, P. *et al.* Effects of topical corticosteroids on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis: in vitro comparison on HaCaT. **International Journal Pharmaceutics**, v.479, n. 2, p. 422-429, 2015.

GUILHERME, V. A.; RIBEIRO, L. N. M.; ALCÂNTARA, A. C. S.; CASTRO, S. R. *et al.* Improved efficacy of naproxen-loaded NLC for temporomandibular joint administration. **Scientific Reports**, v.9, n. 1, p. 11160, 2019.

GUILLOTEAU, K.; PARIS, I.; PEDRETTI, N.; BONIFACE, K. *et al.* Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 { α }, and TNF- α Recapitulates Some Features of Psoriasis. **Journal Immunology**, v.184, n. 9, p. 5263-5270, 2010.

GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. **Anti-inflammatory nutraceuticals and chronic diseases**. Springer, 2016.

GUTOWSKA-OWSIK, D.; SCHAUPP, A.; SALIMI, M.; TAYLOR, S. *et al.* Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. **Journal British Journal of Dermatology**, v.165, n. 3, p. 492-498, 2016.

GUTTMAN-YASSKY, E.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; CHIRICOZZI, A.; NOGRALES, K. E. *et al.* Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. **Journal Allergy Clinical Immunol**, v.124, n. 6, p. 1235-1244.e1258, 2009.

HAJAR, T.; LESHEM, Y. A.; HANIFIN, J. M.; NEDOROST, S. T. *et al.* A systematic review of topical corticosteroid withdrawal ("steroid addiction") in patients with atopic dermatitis and other dermatoses. **Journal American Academy Dermatology**, v.72, n. 3, p. 541-549.e542, 2015.

HAN, F.; LI, S.; YIN, R.; LIU, H. *et al.* Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.315, n. 1, p. 210-216, 2008.

HANIFIN, J. M.; COOPER, K. D.; HO, V. C.; KANG, S. *et al.* Guidelines of care for atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.50, n. 3, p. 391-404, 2004.

HASHIMOTO, D.; CHOW, A.; NOIZAT, C.; TEO, P. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v.38, n. 4, p. 792-804, 2013.

HAYASHI, D.; SUGAYA, H.; OHKOSHI, T.; SEKIZAWA, K. *et al.* Vitamin E improves biochemical indices associated with symptoms of atopic dermatitis-like inflammation in NC/Nga mice. **Journal Nutritional Science Vitaminology (Tokyo)**, v.58, n. 3, p. 161-168, 2012.

HOMEY, B.; STEINHOFF, M.; RUZICKA, T.; LEUNG, D. Y. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.118, n. 1, p. 178-189, 2006.

HOWELL, M. D.; KIM, B. E.; GAO, P.; GRANT, A. V. *et al.* Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.124, n. 3 Suppl 2, p. R7-r12, 2009.

HU, Y.; LIU, S.; LIU, P.; MU, Z. *et al.* Clinical relevance of eosinophils, basophils, serum total IgE level, allergen-specific IgE, and clinical features in atopic dermatitis. **Journal Clinical Laboratory Analysis**, v.34, n. 6, p. e23214, 2020.

HVID, M.; VESTERGAARD, C.; KEMP, K.; CHRISTENSEN, G. B. *et al.* IL-25 in Atopic Dermatitis: A Possible Link between Inflammation and Skin Barrier Dysfunction? **Journal of Investigative Dermatology**, v.131, n. 1, p. 150-157, 2011.

IJAZ, M.; AKHTAR, N. Fatty acids based α -Tocopherol loaded nanostructured lipid carrier gel: In vitro and in vivo evaluation for moisturizing and anti-aging effects. **Journal Cosmetics Dermatology**, v.19, n. 11, p. 3067-3076, 2020.

IMAI, Y.; YASUDA, K.; NAGAI, M.; KUSAKABE, M. *et al.* IL-33-Induced Atopic Dermatitis-Like Inflammation in Mice Is Mediated by Group 2 Innate Lymphoid Cells in Concert with Basophils. **Journal Investigative Dermatology**, v.139, n. 10, p. 2185-2194.e2183, 2019.

REFERÊNCIAS

- ISHIKAWA, J.; NARITA, H.; KONDO, N.; HOTTA, M. *et al.* Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. **Journal Investigative Dermatology**, 130, n. 10, p. 2511-2514, 2010.
- ISLAM, M. T.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. **Pharmaceutical Research**, v.21, n. 7, p. 1192-1199, 2004.
- JAFFARY, F.; FAGHIHI, G.; MOKHTARIAN, A.; HOSSEINI, S. M. Effects of oral vitamin E on treatment of atopic dermatitis: A randomized controlled trial. **Journal Research Medical Science**, v.20, n. 11, p. 1053-1057, 2015.
- JANSSENS, M.; VAN SMEDEN, J.; GOORIS, G. S.; BRAS, W. *et al.* Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. **Journal of Lipid Research**, v.53, n. 12, p. 2755-2766, 2012.
- JAVANBAKHT, M.; KESHAVARZ, S.; MIRSHAFIEY, A.; DJALALI, M. *et al.* The effects of vitamins e and d supplementation on erythrocyte superoxide dismutase and catalase in atopic dermatitis. **Iranian journal of public health**, v.39, n. 1, p. 57-63, 2010.
- JAVANBAKHT, M. H.; KESHAVARZ, S. A.; DJALALI, M.; SIASSI, F. *et al.* Randomized controlled trial using vitamins E and D supplementation in atopic dermatitis. **Journal Dermatology Treatment**, v.22, n. 3, p. 144-150, 2011.
- JENSEN, L. B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v.79, n. 1, p. 68-75, 2011.
- Jl, H.; LI, X.-K. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 2721469, 2016.
- JIA, X.; KIICK, K. L. Hybrid multicomponent hydrogels for tissue engineering. **Macromolecular bioscience**, v.9, n. 2, p. 140-156, 2009.
- JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. **Free Radical Biology Medicine**, v.72, p. 76-90, 2014.
- JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal Pharmaceutics**, v.346, n. 1-2, p. 124-132, 2008.

REFERÊNCIAS

JUNG, S. H.; CHO, Y. S.; JUN, S. S.; KOO, J. S. *et al.* Topical application of liposomal cobalamin hydrogel for atopic dermatitis therapy. **Pharmazie**, v.66, n. 6, p. 430-435, 2011.

KADER, H. A.; AZEEM, M.; JWAYED, S. A.; AL-SHEHHI, A. *et al.* Current Insights into Immunology and Novel Therapeutics of Atopic Dermatitis. **Cells**, v.10, n. 6, 2021.

KALEKAR, L. A.; ROSENBLUM, M. D. Regulatory T cells in inflammatory skin disease: from mice to humans. **International Immunology**, v.31, n. 7, p. 457-463, 2019.

KANCHI, M. M.; SHANMUGAM, M. K.; RANE, G.; SETHI, G. *et al.* Tocotrienols: the unsaturated sidekick shifting new paradigms in vitamin E therapeutics. **Drug Discovery Today**, v.22, n. 12, p. 1765-1781, 2017.

KARN-ORACHAI, K.; SMITH, S. M.; PHUNPEE, S.; TREETHONG, A. *et al.* The effect of surfactant composition on the chemical and structural properties of nanostructured lipid carriers. **Journal Microencapsulation**, v.31, n. 6, p. 609-618, 2014.

KATO, E.; TAKAHASHI, N. Improvement by sodium dl- α -tocopheryl-6-O-phosphate treatment of moisture-retaining ability in stratum corneum through increased ceramide levels. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.20, n. 12, p. 3837-3842, 2012.

KAUKONEN, A. M.; BOYD, B. J.; PORTER, C. J.; CHARMAN, W. N. Drug solubilization behavior during in vitro digestion of simple triglyceride lipid solution formulations. **Pharmaceutical Research**, v.21, n. 2, p. 245-253, 2004.

KAUR, I. P.; KAPILA, M.; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**, v.6, n. 4, p. 271-288, 2007.

KAWAKAMI, T.; ANDO, T.; KIMURA, M.; WILSON, B. S. *et al.* Mast cells in atopic dermatitis. **Current Opinion Immunology**, v.21, n. 6, p. 666-678, 2009.

KAWASAKI, H.; NAGAO, K.; KUBO, A.; HATA, T. *et al.* Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.129, n. 6, p. 1538-1546, 2012.

KEZIC, S.; KEMPERMAN, P. M. J. H.; KOSTER, E. S.; DE JONGH, C. M. *et al.* Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene Lead to Reduced Level of Natural Moisturizing Factor in the Stratum Corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128, n. 8, p. 2117-2119, 2008.

REFERÊNCIAS

KHATER, D.; NSAIRAT, H.; ODEH, F.; SALEH, M. *et al.* Design, preparation, and characterization of effective dermal and transdermal lipid nanoparticles: A review. **Cosmetics**, v.8, n. 2, p. 39, 2021.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.103, p. 598-613, 2018/07/01/2018.

KIEHL, P.; FALKENBERG, K.; VOGELBRUCH, M.; KAPP, A. Tissue eosinophilia in acute and chronic atopic dermatitis: a morphometric approach using quantitative image analysis of immunostaining. **British Journal of Dermatology**, v.145, n. 5, p. 720-729, 2001.

KIKUCHI, K.; TAGAMI, H. Comparison of the effects of daily applications between topical corticosteroid and tacrolimus ointments on normal skin: evaluation with noninvasive methods. **Dermatology**, v.205, n. 4, p. 378-382, 2002.

KIM, B. E.; LEUNG, D. Y.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. **Clinical Immunology**, v.126, n. 3, p. 332-337, 2008.

KIM, B. S.; KIM, I. K.; PARK, Y. J.; KIM, Y. S. *et al.* Conversion of Th2 memory cells into Foxp3+ regulatory T cells suppressing Th2-mediated allergic asthma. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.107, n. 19, p. 8742-8747, 2010.

KIM, B. S.; SIRACUSA, M. C.; SAENZ, S. A.; NOTI, M. *et al.* TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. **Science Translational Medicine**, v.5, n. 170, p. 170ra116, 2013.

KIM, B. S.; WANG, K.; SIRACUSA, M. C.; SAENZ, S. A. *et al.* Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin. **Journal of immunology**, v.193, n. 7, p. 3717-3725, 2014.

KIM, D. H.; LI, K.; SEO, S. J.; JO, S. J. *et al.* Quality of Life and Disease Severity Are Correlated in Patients with Atopic Dermatitis. **Journal Korean Medicine Science**, v.27, n. 11, p. 1327-1332, 2012.

KIM, J. E.; KIM, J. S.; CHO, D. H.; PARK, H. J. Molecular Mechanisms of Cutaneous Inflammatory Disorder: Atopic Dermatitis. **Internatinal Journal Molecular Science**, v.17, n. 8, 2016.

KRAFT, S.; NOVAK, N.; KATOH, N.; BIEBER, T. *et al.* Aggregation of the high-affinity IgE receptor Fc(epsilon)RI on human monocytes and dendritic cells induces

REFERÊNCIAS

- NF-kappaB activation. **Journal Investigative Dermatology**, v.118, n. 5, p. 830-837, 2002.
- KRUK, J.; DUCHNIK, E. Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity. **Asian Pacific Journal Cancer Prevetion**, v.15, n. 2, p. 561-568, 2014.
- KUMAR, A.; RAO, K. M.; KWON, S. E.; LEE, Y. N. *et al.* Xanthan gum/bioactive silica glass hybrid scaffolds reinforced with cellulose nanocrystals: Morphological, mechanical and in vitro cytocompatibility study. **Materials Letters**, v.193, p. 274-278, 2017.
- KUO, I. H.; YOSHIDA, T.; DE BENEDETTO, A.; BECK, L. A. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.131, n. 2, p. 266-278, 2013.
- LAMBERS, H.; PIESSENS, S.; BLOEM, A.; PRONK, H. *et al.* Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **International Journal Cosmetic Science**, v.28, n. 5, p. 359-370, 2006.
- LANDHEER, J.; GIOVANNONE, B.; MATTSON, J. D.; TJABRINGA, S. *et al.* Epicutaneous application of house dust mite induces thymic stromal lymphopietin in nonlesional skin of patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.132, n. 5, p. 1252-1254, 2013.
- LANGAN, S. M.; IRVINE, A. D.; WEIDINGER, S. Atopic dermatitis. **Lancet**, v.396, n. 10247, p. 345-360, 2020.
- LAU, H. K.; KIICK, K. L. Opportunities for multicomponent hybrid hydrogels in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v.16, n. 1, p. 28-42, 2015.
- LAUTERBACH, A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. **European Journal Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v.97, n. Pt A, p. 152-163, 2015.
- LEE, J.; LEE, P.; WU, X. Molecular and cytoskeletal regulations in epidermal development. **Seminars Cell Developmental Biology**, v.69, p. 18-25, 2017.
- LEHTO, M.; SAVINKO, T.; WOLFF, H.; KVIST, P. H. *et al.* A murine model of epicutaneous protein sensitization is useful to study efficacies of topical drugs in atopic dermatitis. **International Immunopharmacology**, v.10, n. 4, p. 377-384, 2010.
- LEUNG, D. Y. Atopic dermatitis: immunobiology and treatment with immune modulators. **Clinical and Experimental Immunology**, v.107, p. 25-30, 1997.

REFERÊNCIAS

LEUNG, D. Y. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. **Allergology International**, v.62, n. 2, p. 151-161, 2013.

LEUNG, D. Y.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I. *et al.* New insights into atopic dermatitis. **Journal Clinical Investigative**, v.113, n. 5, p. 651-657, 2004.

LEUNG, D. Y.; HIRSCH, R. L.; SCHNEIDER, L.; MOODY, C. *et al.* Thymopentin therapy reduces the clinical severity of atopic dermatitis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, 85, n. 5, p. 927-933, 1990.

LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.105, n. 5, p. 860-876, 2000.

LEUNG, D. Y. M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I. *et al.* New insights into atopic dermatitis. **The Journal of clinical investigation**, v.113, n. 5, p. 651-657, 2004.

LEUNG, D. Y. M.; GEHA, R. S. Immune mechanisms in atopic dermatitis. **Immunodermatology**, p. 151-167, 1983.

LEVIN, E.; GUPTA, R.; BUTLER, D.; CHIANG, C. *et al.* Topical steroid risk analysis: differentiating between physiologic and pathologic adrenal suppression. **Journal Dermatology Treatment**, 25, n. 6, p. 501-506, 2014.

LHERM, C.; MÜLLER, R. H.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P. Alkylcyanoacrylate drug carriers: II. Cytotoxicity of cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length. **International Journal of Pharmaceutics**, v.84, n. 1, p. 13-22, 1992.

LI, H.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; GUO, Y. *et al.* Update on the Pathogenesis and Therapy of Atopic Dermatitis. **Clinical Review Allergy Immunology**, v.61, n. 3, p. 324-338, Dec 2021.

LIM, Q. Y; M.M.. Rheological and physicochemical characterization of alpha-tocopherol loaded lipid nanoparticles in thermoresponsive gel for topical application. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v.13, n.3, p. 248-252, 2017.

LIU, F.-T.; GOODARZI, H.; CHEN, H.-Y. IgE, Mast Cells, and Eosinophils in Atopic Dermatitis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.41, n. 3, p. 298-310, 2011.

REFERÊNCIAS

- LOO, C.; BASRI, M.; ISMAIL, R.; LAU, H. *et al.* Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. **International Journal Nanomedicine**, v.8, p. 13-22, 2013.
- LÓPEZ-GARCÍA, R.; GANEM-RONDERO, A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): occlusive effect and penetration enhancement ability. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v.5, n. 02, p. 62, 2015.
- LU, B.; HUANG, Y.; CHEN, Z.; YE, J. *et al.* Niosomal Nanocarriers for Enhanced Skin Delivery of Quercetin with Functions of Anti-Tyrosinase and Antioxidant. **Molecules**, v.24, n. 12, 2019.
- LUCKY, A. W.; LEACH, A. D.; LASKARZEWSKI, P.; WENCK, H. Use of an emollient as a steroid-sparing agent in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis in children. **Pediatric Dermatology**, 14, n. 4, p. 321-324, Jul-Aug 1997.
- LUGER, T.; AMAGAI, M.; DRENO, B.; DAGNELIE, M. A. *et al.* Atopic dermatitis: Role of the skin barrier, environment, microbiome, and therapeutic agents. **Journal Dermatology Science**, v.102, n. 3, p. 142-157, 2021.
- LY, S.; AMICI, J. M. Role of betamethasone valerate 2.250 mg medicated plaster in the treatment of psoriasis and other dermatological pathologies: a review. **Drugs Context**, v.7, p. 212539, 2018.
- MA, Q.; WANG, Y.; LIN, X.; LUO, D. *et al.*, 2007, Preparation, characterization and photoprotection of tocopherol loaded nanostructured lipid carriers. **IEEE**, p.203-208, 2007.
- MAHAMONGKOL, H.; BELLANTONE, R. A.; STAGNI, G.; PLAKOGIANNIS, F. M. Permeation study of five formulations of alpha-tocopherol acetate through human cadaver skin. **Journal Cosmetic Science**, v.56, n. 2, p. 91-103, 2005.
- MAHMOOD, A.; RAPALLI, V. K.; WAGHULE, T.; GORANTLA, S. *et al.* UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of betamethasone valerate and tazarotene with absorption factor method: Application for in-vitro and ex-vivo characterization of lipidic nanocarriers for topical delivery. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.235, p. 118310, 2020.
- MAIER, E.; MITTERMEIR, M.; ESS, S.; NEUPER, T. *et al.* Prerequisites for Functional Interleukin 31 Signaling and Its Feedback Regulation by Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3). **Journal Biological Chemistry**, v.290, n. 41, p. 24747-24759, 2015.

MAISANI, M.; PEZZOLI, D.; CHASSANDE, O.; MANTOVANI, D. Cellularizing hydrogel-based scaffolds to repair bone tissue: How to create a physiologically relevant micro-environment? **Journal Tissue Engineering**, v.8, p. 2041731417712073, 2017.

MALIYAR, K.; SIBBALD, C.; POPE, E.; GARY SIBBALD, R. Diagnosis and Management of Atopic Dermatitis: A Review. **Advances Skin Wound Care**, v.31, n. 12, p. 538-550, 2018.

MANDLIK, D. S.; MANDLIK, S. K. Atopic dermatitis: new insight into the etiology, pathogenesis, diagnosis and novel treatment strategies. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v.43, n. 2, p. 105-125, 2021.

MASAKI, H.; OKANO, Y.; OCHIAI, Y.; OBAYASHI, K. *et al.* alpha-tocopherol increases the intracellular glutathione level in HaCaT keratinocytes. **Free Radical Research**, v.36, n. 6, p. 705-709, 2002.

MASHIKO, S.; MEHTA, H.; BISSONNETTE, R.; SARFATI, M. Increased frequencies of basophils, type 2 innate lymphoid cells and Th2 cells in skin of patients with atopic dermatitis but not psoriasis. **Journal Dermatology Science**, v.88, n. 2, p. 167-174, 2017.

MASUDA, K.; KATOH, N.; OKUDA, F.; KISHIMOTO, S. Increased levels of serum interleukin-16 in adult type atopic dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica**, v.83, n. 4, p. 249-253, 2003.

MATSUI, K.; NISHIKAWA, A. Percutaneous application of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces an increase in mast cell numbers in the dermis of mice. **Clinical & Experimental Allergy**, v.35, n. 3, p. 382-387, 2005.

MATSUI, K.; TAMAI, S.; IKEDA, R. Betamethasone, but Not Tacrolimus, Suppresses the Development of Th2 Cells Mediated by Langerhans Cell-Like Dendritic Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.39, n. 7, p. 1220-1223, 2016.

MAUPAS, C.; MOULARI, B.; BÉDUNEAU, A.; LAMPRECHT, A. *et al.* Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. **International Journal Pharmaceutics**, v.411, n. 1-2, p. 136-141, 2011.

MAYBA, J. N.; GOODERHAM, M. J. Review of Atopic Dermatitis and Topical Therapies. **Journal Cutaneous Medicine Surgery**, v.21, n. 3, p. 227-236, 2017.

MCLEAN, W. H.; IRVINE, A. D. Heritable filaggrin disorders: the paradigm of atopic dermatitis. **Journal Investigative Dermatology**, v.132, n. E1, p. E20-21, 2012.

REFERÊNCIAS

MEINDL, S.; VACULIK, C.; MEINGASSNER, J. G.; KRAMER, G. *et al.* Differential effects of corticosteroids and pimecrolimus on the developing skin immune system in humans and mice. **Journal Investigative Dermatology**, v.129, n. 9, p. 2184-2192, 2009.

MICAN, J. A.; ARORA, N.; BURD, P. R.; METCALFE, D. D. Passive cutaneous anaphylaxis in mouse skin is associated with local accumulation of interleukin-6 mRNA and immunoreactive interleukin-6 protein. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.90, n. 5, p. 815-824, 1992.

MIRON-MENDOZA, M.; SEEMANN, J.; GRINNELL, F. The differential regulation of cell motile activity through matrix stiffness and porosity in three dimensional collagen matrices. **Biomaterials**, v.31, n. 25, p. 6425-6435, 2010.

MIZUTANI, Y.; TAKAGI, N.; NAGATA, H.; INOUE, S. Interferon- γ downregulates tight junction function, which is rescued by interleukin-17A. **Experimental Dermatology**, v.30, n. 12, p. 1754-1763, 2021.

MOHAMED, M. I.; KASSEM, M. A.; KHALIL, R. M.; YOUNIS, M. *et al.* Enhancement of the anti-inflammatory efficacy of betamethasone valerate via niosomal encapsulation. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v.11, p. 14640-14660, 2021.

MOHD ZAFFARIN, A. S.; NG, S. F.; NG, M. H.; HASSAN, H. *et al.* Pharmacology and Pharmacokinetics of Vitamin E: Nanoformulations to Enhance Bioavailability. **Internatinal Journal Nanomedicine**, v.15, p. 9961-9974, 2020.

MÖLLER, A.; LIPPERT, U.; LESSMANN, D.; KOLDE, G. *et al.* Human mast cells produce IL-8. **Journal of Immunology**, v.151, n. 6, p. 3261-3266, 1993.

MORIZANE, S.; YAMASAKI, K.; KAJITA, A.; IKEDA, K. *et al.* TH2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.130, n. 1, p. 259-2610, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v.65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, S.; RAY, S.; THAKUR, R. S. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.71, n. 4, p. 349-358, 2009.

MÜLLER, R.; SOUTO, E.; ALEMIEDA, A. J. Topical delivery of oily actives using solid lipid particles. **Pharmaceutical Technology Europe**, v.19, n. 12, p. 28-32, 2007.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal Pharmaceutics**, v.242, n. 1-2, p. 121-128, 2002.

MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technologies**, v.8, n. 3, p. 207-227, 2011.

NAGAICH, U.; GULATI, N. Preclinical Assessment of Steroidal Nanostructured Lipid Carriers Based Gels for Atopic Dermatitis: Optimization and Product Development. **Current Drug Delivery**, v.15, n. 5, p. 641-651, 2018.

NAKACH, M.; AUTHELIN, J. R.; TADROS, T.; GALET, L. *et al.* Engineering of nano-crystalline drug suspensions: employing a physico-chemistry based stabilizer selection methodology or approach. **International Journal Pharmaceutics**, v.476, n. 1-2, p. 277-288, 2014.

NAKAJIMA, S.; KITOH, A.; EGAWA, G.; NATSUAKI, Y. *et al.* IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. **Journal Investigative Dermatology**, v.134, n. 8, p. 2122-2130, 2014.

NATSUME, C.; AOKI, N.; AOYAMA, T.; SENDA, K. *et al.* Fucoxanthin Ameliorates Atopic Dermatitis Symptoms by Regulating Keratinocytes and Regulatory Innate Lymphoid Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n. 6, 2020.

NEDOSZYTKO, B.; RESZKA, E.; GUTOWSKA-OWSIK, D.; TRZECIAK, M. *et al.* Genetic and Epigenetic Aspects of Atopic Dermatitis. **International Journal Molecular Sciences**, v.21, n. 18, 2020.

NIEDNER, R. [Therapy with systemic glucocorticoids]. **Hautarzt**, v.52, n. 11, p. 1062-1071; quiz 1072-1064, 2001.

NISHI, N.; YAMAMOTO, S.; OU, W.; MURO, E. *et al.* Enhanced CCL26 production by IL-4 through IFN-gamma-induced upregulation of type 1 IL-4 receptor in keratinocytes. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.376, n. 1, p. 234-240, 2008.

NOGUCHI, A.; TOMINAGA, M.; TAKAHASHI, N.; MATSUDA, H. *et al.* Differences in therapeutic effects of topically applied corticosteroid and tacrolimus on atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. **Journal Dermatolofy Sciences**, v.86, n. 1, p. 54-62, 2017.

REFERÊNCIAS

- NOVAK, N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. . **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.129, n. 4, p. 879-886, 2012.
- NOVAK, N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.129, n. 4, p. 879-886, 2012.
- NOVAK, N.; BIEBER, T.; KRAFT, S. Immunoglobulin E-bearing antigen-presenting cells in atopic dermatitis. **Current Allergy Asthma Reports**, v.4, n. 4, p. 263-269, 2004.
- NOVAK, N.; KOCH, S.; ALLAM, J. P.; BIEBER, T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. . **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, n. 1, p. 50-59, 2010.
- NYGAARD, U.; HVID, M.; JOHANSEN, C.; BUCHNER, M. *et al.* TSLP, IL-31, IL-33 and sST2 are new biomarkers in endophenotypic profiling of adult and childhood atopic dermatitis. **Journal European Academy of Dermatology Venereology**, v.30, n. 11, p. 1930-1938, 2016.
- O'REGAN, G. M.; SANDILANDS, A.; MCLEAN, W. H. I.; IRVINE, A. D. Filaggrin in atopic dermatitis. . **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.122, n. 4, p. 689-693, 2008.
- O'REGAN, G. M.; SANDILANDS, A.; MCLEAN, W. H. I.; IRVINE, A. D. Filaggrin in atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.124, n. 3, Supplement 2, p. R2-R6, 2009.
- ODHIAMBO, J. A.; WILLIAMS, H. C.; CLAYTON, T. O.; ROBERTSON, C. F. *et al.* Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. . **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.124, n. 6, p. 1251-1258.e1223, 2009.
- OLIVEIRA, M. S.; ARYASOMAYAJULA, B.; PATTNI, B.; MUSSI, S. V. *et al.* Solid lipid nanoparticles co-loaded with doxorubicin and α -tocopherol succinate are effective against drug-resistant cancer cells in monolayer and 3-D spheroid cancer cell models. **International Journal Pharmaceutics**, v.512, n. 1, p. 292-300, 2016.
- ORFALI, R. L.; SHIMIZU, M. M.; TAKAOKA, R.; ZANIBONI, M. C. *et al.* Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v.59, n. 3, p. 270-275, 2013.
- ORTIZ, A. C.; YAÑEZ, O.; SALAS-HUENULEO, E.; MORALES, J. O. Development of a Nanostructured Lipid Carrier (NLC) by a Low-Energy Method, Comparison of

REFERÊNCIAS

- Release Kinetics and Molecular Dynamics Simulation. **Pharmaceutics**, v.13, n. 4, p. 531, 2021.
- PALMER, C. N.; IRVINE, A. D.; TERRON-KWIATKOWSKI, A.; ZHAO, Y. *et al.* Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nature Genetics**, v.38, n. 4, p. 441-446, 2006.
- PALMESE, L. L.; THAPA, R. K.; SULLIVAN, M. O.; KIICK, K. L. Hybrid hydrogels for biomedical applications. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v.24, p. 143-157, 2019.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Materials**, v.3, n. 3, p. 1863-1887, 2010.
- PARISH, W. E.; READ, J.; PATERSON, S. E. Changes in basal cell mitosis and transepidermal water loss in skin cultures treated with vitamins C and E. **Experimental Dermatology**, v.14, n. 9, p. 684-691, 2005.
- PATERNOSTER, L.; STANDL, M.; WAAGE, J.; BAURECHT, H. *et al.* Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. **Nature Genetics**, v.47, n. 12, p. 1449-1456, 2015.
- PATRIZI, A.; RAONE, B.; NERI, I.; GURIOLI, C. *et al.* Randomized, controlled, double-blind clinical study evaluating the safety and efficacy of MD2011001 cream in mild-to-moderate atopic dermatitis of the face and neck in children, adolescents and adults. **Journal Dermatology Treatment**, v.27, n. 4, p. 346-350, 2016.
- PEH, H. Y.; TAN, W. S.; LIAO, W.; WONG, W. S. Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. **Pharmacology Therapy**, v.162, p. 152-169, 2016.
- PELLEFIGUES, C.; NAIDOO, K.; MEHTA, P.; SCHMIDT, A. J. *et al.* Basophils promote barrier dysfunction and resolution in the atopic skin. . **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.148, n. 3, p. 799-812.e710, 2021.
- PELTONEN, S.; RIEHOKAINEN, J.; PUMMI, K.; PELTONEN, J. Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis. **British Journal Dermatology**, v.156, n. 3, p. 466-472, 2007.
- PENG, W.; NOVAK, N. Pathogenesis of atopic dermatitis. **Clinical Experimental Allergy**, v.45, n. 3, p. 566-574, 2015.

- PENG, W. M.; MAINTZ, L.; ALLAM, J. P.; NOVAK, N. Attenuated TGF- β 1 responsiveness of dendritic cells and their precursors in atopic dermatitis. **European Journal Immunology**, v.43, n. 5, p. 1374-1382, 2013.
- PESCE, G.; MARCON, A.; CAROSSO, A.; ANTONICELLI, L. *et al.* Adult eczema in Italy: prevalence and associations with environmental factors. **Journal European Academy Dermatology Venereology**, v.29, n. 6, p. 1180-1187, 2015.
- PHIPPS, S.; YING, S.; WANGOO, A.; ONG, Y. E. *et al.* The relationship between allergen-induced tissue eosinophilia and markers of repair and remodeling in human atopic skin. **Journal Immunology**, v.169, n. 8, p. 4604-4612, 2002.
- PIMENTEL-MORAL, S.; TEIXEIRA, M. C.; FERNANDES, A. R.; BORRÁS-LINARES, I. *et al.* Polyphenols-enriched Hibiscus sabdariffa extract-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): Optimization by multi-response surface methodology. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.49, p. 660-667, 2019.
- PRAÇA, F. G.; VIEGAS, J. S. R.; PEH, H. Y.; GARBIN, T. N. *et al.* Microemulsion co-delivering vitamin A and vitamin E as a new platform for topical treatment of acute skin inflammation. **Materials Science Engineering C – Materials for Biological Applications**, v.110, p. 110639, 2020.
- PROKSCH, E. pH in nature, humans and skin. **Journal Dermatology**, v.45, n. 9, p. 1044-1052, 2018.
- PUGLIA, C.; BONINA, F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.9, n. 4, p. 429-441, 2012.
- RAAP, U.; WEIßMANTEL, S.; GEHRING, M.; EISENBERG, A. M. *et al.* IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. **Pediatric Allergy Immunology**, v.23, n. 3, p. 285-288, 2012.
- RAMIREZ, J. M.; BREMBILLA, N. C.; SORG, O.; CHICHEPORTICHE, R. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. **European Journal Immunology**, v.40, n. 9, p. 2450-2459, 2010.
- RERKNIMITR, P.; OTSUKA, A.; NAKASHIMA, C.; KABASHIMA, K. The etiopathogenesis of atopic dermatitis: barrier disruption, immunological derangement, and pruritus. **Inflammation and Regeneration**, v.37, p. 14, 2017.

REFERÊNCIAS

RIBEIRO, L. N. M.; BREITKREITZ, M. C.; GUILHERME, V. A.; DA SILVA, G. H. R. *et al.* Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal Pharmaceutic Sciences**, v.106, p. 102-112, 2017.

RICARDO-GONZALEZ, R. R.; VAN DYKEN, S. J.; SCHNEIDER, C.; LEE, J. *et al.* Tissue signals imprint ILC2 identity with anticipatory function. **Nature Immunology**, v.19, n. 10, p. 1093-1099, 2018.

RISSOAN, M. C.; SOUMELIS, V.; KADOWAKI, N.; GROUARD, G. *et al.* Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. **Science**, v.283, n. 5405, p. 1183-1186, 1999.

ROAN, F.; OBATA-NINOMIYA, K.; ZIEGLER, S. F. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. **Journal Clinical Investigation**, v.129, n. 4, p. 1441-1451, 2019.

RODRIGUES DA SILVA, G. H.; GERONIMO, G.; GARCÍA-LÓPEZ, J. P.; RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Articaine in functional NLC show improved anesthesia and anti-inflammatory activity in zebrafish. **Science Reports**, v.10, n. 1, p. 19733, 2020.

ROEDIGER, B.; KYLE, R.; LE GROS, G.; WENINGER, W. Dermal group 2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis and allergy. **Current Opinion Immunology**, v.31, p. 108-114, 2014.

RUIZ, R. G.; KEMENY, D. M.; PRICE, J. F. Higher risk of infantile atopic dermatitis from maternal atopy than from paternal atopy. **Clinical Experimental Allergy**, v.22, n. 8, p. 762-766, 1992.

SACOTTE, R.; SILVERBERG, J. I. Epidemiology of adult atopic dermatitis. **Clinical Dermatology**, v.36, n. 5, p. 595-605, 2018.

SAEZ, V.; SOUZA, I. D. L.; MANSUR, C. R. E. Lipid nanoparticles (SLN & NLC) for delivery of vitamin E: a comprehensive review. **International Journal Cosmetic Sciences**, v.40, n. 2, p. 103-116, 2018.

SALAMON, P.; SHOHAM, N. G.; GAVRIELI, R.; WOLACH, B. *et al.* Human mast cells release Interleukin-8 and induce neutrophil chemotaxis on contact with activated T cells. **Allergy**, v.60, n. 10, p. 1316-1319, 2005.

SALIMI, M.; BARLOW, J. L.; SAUNDERS, S. P.; XUE, L. *et al.* A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. **Journal Experimental Medicine**, v.210, n. 13, p. 2939-2950, 2013.

REFERÊNCIAS

SALIMIAN, J.; SALEHI, Z.; AHMADI, A.; EMAMVIRDIZADEH, A. *et al.* Atopic dermatitis: molecular, cellular, and clinical aspects. **Molecular Biology Reports**, 2022.

SALVI, V. R.; PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.51, p. 255-267, 2019.

SANDSTRÖM, M. H.; FAERGEMANN, J. Prognosis and prognostic factors in adult patients with atopic dermatitis: a long-term follow-up questionnaire study. **British Journal Dermatology**, v.150, n. 1, p. 103-110, 2004.

SATARKAR, N. S.; BISWAL, D.; HILT, J. Z. J. S. M. Hydrogel nanocomposites: a review of applications as remote controlled biomaterials. **Acta Biomaterials**, v. 6, n. 11, p. 2364-2371, 2010.

SATOR, P. G.; SCHMIDT, J. B.; HONIGSMANN, H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. **Journal American Academy Dermatology**, v.48, n. 3, p. 352-358, 2003.

SCHARSCHMIDT, T. C.; MAN, M. Q.; HATANO, Y.; CRUMRINE, D. *et al.* Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.124, n. 3, p. 496-506, 506.e491-496, 2009.

SCHAUBER, J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.122, n. 2, p. 261-266, 2008.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology Physiology**, v.19, n. 6, p. 296-302, 2006.

SCHÖLER, N.; OLBRICH, C.; TABATT, K.; MÜLLER, R. H. *et al.* Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. **International Journal Pharmaceutics**, v.221, n. 1-2, p. 57-67, 2001.

SCHREML, S.; MEIER, R. J.; WOLFBEIS, O. S.; LANDTHALER, M. *et al.* 2D luminescence imaging of pH in vivo. **Proceedings of the National Academy Sciences U S A**, v.108, n. 6, p. 2432-2437, 2011.

SCHWARTZ, C.; MORAN, T.; SAUNDERS, S. P.; KASZLIKOWSKA, A. *et al.* Spontaneous atopic dermatitis in mice with a defective skin barrier is independent of ILC2 and mediated by IL-1 β . **Allergy**, v.74, n. 10, p. 1920-1933, 2019.

REFERÊNCIAS

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. **Cytokine & growth factor reviews**, v.25, n. 4, p. 453-472, 2014.

SEGGER, D.; ABMUS, U.; BROCK, M.; ERASMY, J. *et al.* Multicenter study on measurement of the natural pH of the skin surface. **International Journal of Cosmetic Science**, v.30, n. 1, p. 75-75, 2008.

SELTMANN, J.; ROESNER, L. M.; VON HESLER, F. W.; WITTMANN, M. *et al.* IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of filaggrin. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.135, n. 6, p. 1659-1661.e1654, 2015.

SEN, C. K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Science**, v.78, n. 18, p. 2088-2098, 2006.

SENYİĞİT, T.; TEKMEN, I.; SÖNMEZ, U.; SANTI, P. *et al.* Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal Pharmaceutics**, v.403, n. 1-2, p. 123-129, 2011.

SHARMA, K.; THARMATT, A.; SALOORIA, S.; SHARMA, R. *et al.* Topical Corticosteroids in Treatment of Atopic Dermatitis: An Overview of Their Current Status.

SHETTY, K.; SHERJE, A. P. Nano intervention in topical delivery of corticosteroid for psoriasis and atopic dermatitis—a systematic review. **Journal of Materials Science Materials Medicine**, v.32, n. 8, p. 88, 2021.

SHIN, S. R.; JUNG, S. M.; ZALABANY, M.; KIM, K. *et al.* Carbon-nanotube-embedded hydrogel sheets for engineering cardiac constructs and bioactuators. **American Chemical Society Nano**, v.7, n. 3, p. 2369-2380, 2013.

SIDBURY, R.; DAVIS, D. M.; COHEN, D. E.; CORDORO, K. M. *et al.* Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. **Journal American Academy Dermatology**, v.71, n. 2, p. 327-349, 2014.

SIDBURY, R.; TOM, W. L.; BERGMAN, J. N.; COOPER, K. D. *et al.* Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 4. Prevention of disease flares and use of adjunctive therapies and approaches. **Journal American Academy Dermatology**, v.71, n. 6, p. 1218-1233, 2014.

SIMON, D.; BRAATHEN, L. R.; SIMON, H. U. Eosinophils and atopic dermatitis. **Allergy**, v.59, n. 6, p. 561-570, 2004.

SINGH, S.; BEHL, T.; SHARMA, N.; ZAHOOR, I. *et al.* Targeting therapeutic approaches and highlighting the potential role of nanotechnology in atopic dermatitis. **Environmental Science Pollution Research International**, v.29, n. 22, p. 32605-32630, 2022.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; NAKAMURA, C.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. *et al.* Glucocorticoid entrapment into lipid carriers--characterisation by paelectric spectroscopy and influence on dermal uptake. **Journal Control Release**, v.97, n. 3, p. 493-502, 2004.

SONI, K.; KUKEREJA, B. K.; KAPUR, M.; KOHLI, K. Lipid nanoparticles: future of oral drug delivery and their current trends and regulatory issues. **International Journal Current Pharmaceutical Review and Research**, v.7, n. 1, p. 1-8, 2015.

SOUTO, E. B.; ALMEIDA, A. J.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles (SLN®, NLC®) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.3, n. 4, p. 317-331, 2007.

SROKA-TOMASZEWSKA, J.; TRZECIAK, M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. **International journal of molecular sciences**, v.22, n. 8, p. 4130, 2021.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, v.299, n. 6710, p. 1259, 1989.

SUKHANOVA, A.; BOZROVA, S.; SOKOLOV, P.; BERESTOVOY, M. *et al.* Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. **Nanoscale Research Letters**, v.13, n. 1, p. 44, 2018.

TEO, C. W. L.; TAY, S. H. Y.; TEY, H. L.; UNG, Y. W. *et al.* Vitamin E in Atopic Dermatitis: From Preclinical to Clinical Studies. **Dermatology**, v.237, n. 4, p. 553-564, 2021.

THIELE, J. J.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S. Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. **Molecular Aspects Medicine**, v.28, n. 5-6, p. 646-667, 2007.

THIELE, J. J.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. **J Investigative Dermatol**, v.110, n. 5, p. 756-761, 1998.

THOMAS, V.; YALLAPU, M. M.; SREEDHAR, B.; BAJPAI, S. K. Breathing-in/breathing-out approach to preparing nanosilver-loaded hydrogels: Highly efficient

REFERÊNCIAS

antibacterial nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v.111, n. 2, p. 934-944, 2009.

THYSSEN, J. P.; KEZIC, S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. . **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.134, n. 4, p. 792-799, 2014.

TOKURA, Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v.58, n. 1, p. 1-7, 2010.

TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. . **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.120, n. 4, p. 744-750; quiz 751-742, 2007.

TORRES, T.; FERREIRA, E. O.; GONÇALO, M.; MENDES-BASTOS, P. *et al.* Update on Atopic Dermatitis. **Acta Medica Portuguesa**, v.32, n. 9, p. 606-613, 2019.

TSAI, M. J.; WU, P. C.; HUANG, Y. B.; CHANG, J. S. *et al.* Baicalein loaded in tocol nanostructured lipid carriers (tocol NLCs) for enhanced stability and brain targeting. **International Journal Pharmaceutics**, v.423, n. 2, p. 461-470, 2012.

TSOURELI-NIKITA, E.; HERCOGOVA, J.; LOTTI, T.; MENCHINI, G. Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. **International Journal Dermatology**, v.41, n. 3, p. 146-150, 2002.

TURNER, N. G.; CULLANDER, C.; GUY, R. H. Determination of the pH gradient across the stratum corneum. **Journal Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v.3, n. 2, p. 110-113, 1998.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. **Journal Cell Sciences**, v.110 (Pt 9), p. 1113-1121, 1997.

VAN SMEDEN, J.; BOUWSTRA, J. A. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. **Current Problems in Dermatology**, v.49, p. 8-26, 2016.

VAZ, S.; SILVA, R.; AMARAL, M. H.; MARTINS, E. *et al.* Evaluation of the biocompatibility and skin hydration potential of vitamin E-loaded lipid nanosystems formulations: In vitro and human in vivo studies. **Colloids Surface B Biointerfaces**, v.179, p. 242-249, 2019.

REFERÊNCIAS

VERHAGEN, J.; AKDIS, M.; TRAJDL-HOFFMANN, C.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. *et al.* Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.117, n. 1, p. 176-183, 2006.

WADONDA-KABONDO, N.; STERNE, J. A.; GOLDING, J.; KENNEDY, C. T. *et al.* Association of parental eczema, hayfever, and asthma with atopic dermatitis in infancy: birth cohort study. **Archives Diseases in Childhood**, v.89, n. 10, p. 917-921, 2004.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. **Nature**, v.445, n. 7129, p. 766-770, 2007.

WANG, Y.; ZHANG, S.; BENOIT, D. S. W. Degradable poly(ethylene glycol) (PEG)-based hydrogels for spatiotemporal control of siRNA/nanoparticle delivery. **Journal Control Release**, v.287, p. 58-66, 2018.

WANG, Y. H.; ANGKASEKWINAI, P.; LU, N.; VOO, K. S. *et al.* IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. **Journal Experimental Medicine**, v.204, n. 8, p. 1837-1847, 2007.

WEIDINGER, S.; BECK, L. A.; BIEBER, T.; KABASHIMA, K. *et al.* Atopic dermatitis. **Nature Review Disease Primers**, v.4, n. 1, p. 1, 2018.

WERFEL, T.; ALLAM, J. P.; BIEDERMANN, T.; EYERICH, K. *et al.* Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.138, n. 2, p. 336-349, 2016.

WOLF-JÜRGENSEN, P. Efficacy of bufexamac cream versus betamethasone valerate cream in contact dermatitis: a double-blind trial. **Current Medicine Research Opinion**, v.5, n. 10, p. 779-784, 1979.

WOLLENBERG, A.; RÄWER, H. C.; SCHAUBER, J. Innate immunity in atopic dermatitis. **Clinical Review Allergy Immunology**, v.41, n. 3, p. 272-281, 2011.

WOLLENBERG, A.; WAGNER, M.; GÜNTHER, S.; TOWAROWSKI, A. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. **Journal Investigative Dermatology**, v.119, n. 5, p. 1096-1102, 2002.

WULLAERT, A.; BONNET, M. C.; PASPARAKIS, M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. **Cell Research**, v.21, n. 1, p. 146-158, 2011.

REFERÊNCIAS

XU, L.; KITANI, A.; FUSS, I.; STROBER, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. **Journal Immunology**, v.178, n. 11, p. 6725-6729, 2007.

YANG, G.; SEOK, J. K.; KANG, H. C.; CHO, Y. Y. *et al.* Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis. **International Journal Molecular Science**, v.21, n. 8, 2020.

YOO, J.; OMORI, M.; GYARMATI, D.; ZHOU, B. *et al.* Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. **Journal Experimental Medicine**, v.202, n. 4, p. 541-549, 2005.

YOSHIDA, K.; KUBO, A.; FUJITA, H.; YOKOUCHI, M. *et al.* Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.134, n. 4, p. 856-864, 2014.

YU, K.; WANG, Y.; WAN, T.; ZHAI, Y. *et al.* Tacrolimus nanoparticles based on chitosan combined with nicotinamide: enhancing percutaneous delivery and treatment efficacy for atopic dermatitis and reducing dose. **International Journal Nanomedicine**, v.13, p. 129-142, 2018.

YUKI, T.; YOSHIDA, H.; AKAZAWA, Y.; KOMIYA, A. *et al.* Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. **Journal Immunology**, v.187, n. 6, p. 3230-3237, 2011.

ŻELECHOWSKA, P.; AGIER, J.; KOZŁOWSKA, E.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. Mast cells participate in chronic low-grade inflammation within adipose tissue. **Obesity Reviews**, v.19, n. 5, p. 686-697, 2018.

ZHANG, J.; HUANG, F.; LIN, Z. Progress of nanocrystalline growth kinetics based on oriented attachment. **Nanoscale**, v.2, n. 1, p. 18-34, 2010.

ZHANG, J.; SMITH, E. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. **Journal Pharmaceutics Science**, v.100, n. 3, p. 896-903, 2011.

ZINGG, J. M. Vitamin E: Regulatory Role on Signal Transduction. **IUBMB Life**, v.71, n. 4, p. 456-478, 2019.

ZOSCHKE, C.; SCHILRREFF, P.; ROMERO, E. L.; BRANDNER, J. M. *et al.* Dendritic nanoparticles for cutaneous drug delivery--testing in human skin and

REFERÊNCIAS

reconstructed human skin. **Current Pharmaceutical Design**, v.21, n. 20, p. 2784-2800, 2015.

Anexos

Anexo 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

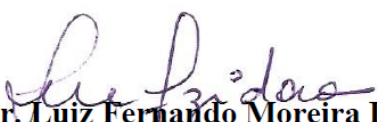
Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação do efeito de formulações lipossomais associadas ou não a betametasona em modelo experimental de indução de Dermatite atópica**”, protocolo nº **029/18**, sob a responsabilidade de **Hellen Dayane Silva Borges** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 10 de Março de 2022.

(We certify that the project entitled “Avaliação do efeito de formulações lipossomais associadas ou não a betametasona em modelo experimental de indução de Dermatite atópica”, protocol 029/18, under the responsibility of Hellen Dayane Silva Borges - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 10th, 2022).

Vigência do Projeto	Início: 15/07/2018 Término: 30/06/2023
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico/ BALB/c
Número de animais	360
Peso/Idade	20g/8-10semanas
Sexo	Fêmeas
Origem/Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal – CBEA/PROPP/UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal – CBEA/PROPP/UFU

Alteração Realizada: Alterou a data término de 10/08/2021 para 30/06/2023.

Uberlândia, 10 de março de 2022.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Comissão de Ética na Utilização de Animais
 Coordenador da CEUA
 Portaria R Nº 1114/2020